

Instrucciones de uso



LymphoTrack® Dx *IGH* (FR1/FR2/FR3) - S5/PGM™

Para identificar y rastrear los reordenamientos genéticos de la cadena pesada de la inmunoglobulina (*IGH*) de los linfocitos B mediante secuenciación de nueva generación y a través de Ion S5™ e Ion PGM™ de Thermo Fisher Scientific®.

IVD Kit de ensayo para uso de diagnóstico *in vitro*.

Representación esquemática del locus del gen de la *IGH* y las regiones marco (FR) objetivo:



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

(Los controles de ADN pueden separarse de los kits de ensayo y conservarse a una temperatura de entre 2°C y 8°C)

Número de catálogo	Productos	Cantidad
REF 91210007	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR1 - S5/PGM	12 índices y 5 reacciones
REF 91210037	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR2 - S5/PGM	12 índices y 5 reacciones
REF 91210047	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR3 - S5/PGM	12 índices y 5 reacciones
REF 91210057	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR1/2/3 - S5/PGM	12 índices y 5 reacciones (cada uno)

Índice

1.	USO PREVISTO	3
2.	RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO	3
2.1.	Antecedentes	3
2.2.	Descripción general	4
3.	PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO.....	5
3.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	5
3.2.	Purificación de amplicones	5
3.3.	Cuantificación de amplicones	5
3.4.	Secuenciación de nueva generación (SNG)	5
3.5.	Multiplicación de amplicones	6
3.6.	Evaluación de la hipermutación somática (HS) de IGHV	6
4.	REACTIVOS.....	7
4.1.	Componentes de los reactivos	7
4.2.	Advertencias y precauciones	10
4.3.	Almacenamiento y manipulación.....	10
5.	INSTRUMENTAL.....	11
6.	RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	12
6.1.	Precauciones	12
6.2.	Sustancias que pueden interferir	12
6.3.	Requisitos y manipulación de las muestras	12
6.4.	Almacenamiento de la muestra	12
7.	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	13
7.1.	Materiales suministrados.....	13
7.2.	Materiales necesarios no suministrados.....	13
7.3.	Preparación de los reactivos	14
7.4.	Amplificación	14
7.5.	Purificación con AMPure XP.....	15
7.6.	Cuantificación de amplicones	16
7.7.	Agrupación y cuantificación de la genoteca.....	19
7.8.	Dilución del conglomerado de la genoteca.....	19
7.9.	Preparación de la plantilla y secuenciación con los sistemas Ion Chef e Ion S5.....	19
7.10.	Preparación de la plantilla y secuenciación con los sistemas Ion OT2 e Ion S5	19
7.11.	Preparación de la plantilla y secuenciación con los sistemas Ion OT2 e Ion PGM	20
7.12.	Configurar una serie programada	21
8.	ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	22
9.	ESPECIFICACIONES DEL ENSAYO	23
10.	LIMITACIONES DE PROCEDIMIENTO.....	23
11.	INTERPRETACIÓN Y ELABORACIÓN DE INFORMES	23
12.	DATOS DE LA MUESTRA	28
13.	RENDIMIENTO	28
14.	GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS	30
15.	SERVICIO TÉCNICO Y ATENCIÓN AL CLIENTE	30
16.	REFERENCIAS	31
17.	SÍMBOLOS	31
18.	AVISO LEGAL	32
19.	KITS DE ENSAYO LYMPHOTrack Dx IGH (FR1/FR2/FR3) PARA ION S5: GUÍA SINTÉTICA	33
20.	KITS DE ENSAYO LYMPHOTrack Dx IGH (FR1/FR2/FR3) PARA ION PGM: GUÍA SINTÉTICA	34
21.	ANEXO A: CONFIGURAR EL COMPLEMENTO FILEEXPORTER Y CARGAR LOS CÓDIGOS DE BARRAS PERSONALIZADOS.....	35
21.1.	Compruebe la configuración del complemento FileExporter.....	35
21.2.	Cargue los códigos de barras personalizados.....	35

1. Uso previsto

Uso previsto (kit de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* FR1 para S5/PGM)

El kit de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* FR1 para S5/PGM es un producto de diagnóstico *in vitro* diseñado para la determinación por secuenciación de nueva generación (SNG) de la frecuencia de reordenamientos del gen *IGH*, así como del grado de hipermutación somática (HS) de los genes reordenados en pacientes con posibilidad de enfermedad linfoproliferativa. Este kit de ensayo resulta de utilidad para la identificación de trastornos linfoproliferativos y para la determinación del pronóstico de la enfermedad con las plataformas Ion S5 o Ion PGM de Thermo Fisher Scientific.

Uso previsto (kit de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* FR1/2/3 para S5/PGM)

El kit de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* FR1 para S5/PGM es un producto de diagnóstico *in vitro*. Este se dirige a la zona de conservación del marco 1 (FR1) en los segmentos V_H del gen de la *IGH* y se ha diseñado para la determinación por secuenciación de nueva generación (SNG) de la frecuencia de reordenamientos del gen de la *IGH* (V_H-J_H), así como del grado de hipermutación somática (HS) de los genes reordenados en pacientes con posibilidad de enfermedad linfoproliferativa. Este kit de ensayo resulta de utilidad para la identificación de trastornos linfoproliferativos y para la determinación del pronóstico de la enfermedad con las plataformas Ion S5 o Ion PGM de Thermo Fisher Scientific.

El kit de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* FR2 para S5/PGM es un producto de diagnóstico *in vitro* diseñado para la secuenciación de nueva generación (SNG) a través de los instrumentos Ion S5 o Ion PGM de Thermo Fisher Scientific. Este kit de ensayo determina la distribución de la frecuencia de los reordenamientos génicos *IGH* V_H-J_H en pacientes con posibilidad de enfermedad linfoproliferativa. Este kit de ensayo resulta de utilidad para la identificación de trastornos linfoproliferativos con las plataformas Ion S5 o Ion PGM de Thermo Fisher Scientific.

El kit de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* FR3 para S5/PGM es un producto de diagnóstico *in vitro* diseñado para la secuenciación de nueva generación (SNG) a través de los instrumentos Ion PGM o Ion S5 de Thermo Fisher Scientific. Este kit de ensayo determina la distribución de la frecuencia de los reordenamientos génicos *IGH* V_H-J_H en pacientes con posibilidad de enfermedad linfoproliferativa. Este kit de ensayo resulta de utilidad para la identificación de trastornos linfoproliferativos con las plataformas Ion S5 o Ion PGM de Thermo Fisher Scientific.

2. Resumen y explicación del ensayo

2.1. Antecedentes

El locus del gen de cadena pesada de la inmunoglobulina (*IGH*), situado en el cromosoma 14 (14q32.3), abarca 46-52 segmentos de genes variables funcionales y 30 no funcionales (V_H), 27 segmentos de genes de diversidad funcional (D_H) y 6 segmentos de genes de unión funcional (J_H), repartidos entre 1250 kilobases. Los segmentos génicos V_H contienen tres marcos (FR) y dos regiones variables determinantes de la complementariedad (CDR).

Las células linfoides son distintas del resto de células somáticas del organismo. Durante el desarrollo, los genes del receptor de antígenos de las células linfoides se someten a un reordenamiento somático (Tonegawa, S., 1983). Durante el desarrollo de los linfocitos B, por ejemplo, los genes que codifican las moléculas de *IGH* se ensamblan a partir de múltiples segmentos de genes polimórficos sujetos a reordenamiento y selección, lo que da lugar a combinaciones V_H-D_H-J_H únicas tanto en longitud como en secuencia. Dado que las leucemias y los linfomas derivan de la transformación de células linfoides individuales, las células con carga de leucemia y linfoma suelen compartir uno o más reordenamientos del gen del receptor del antígeno celular o clonal. Por lo tanto, las pruebas de detección de los reordenamientos clonales de *IGH* resultan de utilidad para el estudio de las neoplasias de los linfocitos B y T.

Por otro lado, el estado de hipermutación de los genes de la región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina (*IGHV*) suministra información pronóstica importante para los pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) y linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP). Existe hipermutación somática (HS) en *IGHV* cuando la diferencia con la secuencia V_H de la estirpe germinal es mayor o igual al 2 %. Por el contrario, se considera que no hay signos de HS cuando la diferencia es inferior al 2 %. El estado de HS de los clones es clínicamente significativo para la LLC-B, ya que existe una diferencia clara entre la mediana de la supervivencia de los pacientes con y sin HS. La hipermutación en la región de la *IGHV* representa un buen factor pronóstico, mientras que la ausencia de mutación indica un mal pronóstico (Ghia, P. *et al.*, 2007).

Al principio, los reordenamientos clonales se identificaban mediante la técnica de fragmentos de restricción e hibridación por Southern (RF-SBH). Sin embargo, estas pruebas resultaban engorrosas y laboriosas, requerían grandes

cantidades de ADN y no eran adecuadas para el análisis de muchos de los locus de los receptores de los antígenos menos diversos.

A lo largo de las últimas décadas, la técnica de RF-SBH se ha visto reemplazada por la prueba de clonalidad mediante PCR, que desarrolló Alexander Morley (Trainor, K. J. *et al.*, 1990) y que se considera el método de referencia en la actualidad. Estas pruebas identifican la clonalidad mediante la sobrerepresentación del reordenamiento del gen V_H-D_H-J_H amplificado (o D_H-J_H incompletos) después de su separación y a través de electroforesis capilar o en gel. A pesar de su sensibilidad y adecuación a las pequeñas cantidades de ADN, estas pruebas no distinguen con facilidad entre poblaciones clonales y reordenamientos múltiples bajo un pico de un solo tamaño ni se han diseñado para la identificación de la secuencia de ADN V_H-J_H específica, necesaria para rastrear poblaciones clonales en análisis posteriores.

2.2. Descripción general

Los kits de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* (FR1/FR2/FR3) para Ion S5/PGM (se venden en conjunto o por separado) representan una mejora significativa con respecto a los kits de ensayo de clonalidad existentes, que usan análisis de fragmentos para detectar la mayor parte de los reordenamientos del gen *IGH* e identifican la secuencia de ADN específica para cada reordenamiento del gen clonal. Estos kits de ensayo presentan, de este modo, dos usos importantes y complementarios: suministran información esencial sobre la existencia de clonalidad e identifican la información secuencial necesaria para rastrear dichos clones en muestras posteriores. El kit de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* FR1 suministra, además, información secuencial detallada sobre el grado de HS.

Las mezclas maestras múltiples se dirigen a las zonas de conservación de *IGH* (FR1, FR2 o FR3) en las zonas V_H y J_H de las neoplasias malignas de corte linfóide. Dirigirse a las tres regiones marco reduce significativamente el riesgo de no poder detectar la presencia de clonalidad, ya que las hipermutaciones somáticas en los puntos de fijación del cebador de los segmentos del gen V_H implicados pueden impedir la amplificación del ADN (Evans, P. A. *et al.*, 2007). **Son necesarios datos de las tres regiones marco para determinar signos de clonalidad en la muestra.**

Los cebadores incluidos en las mezclas maestras se han diseñado para los adaptadores de Thermo Fisher Scientific y abarcan hasta 12 índices distintos. Estos kits de ensayo posibilitan la ejecución de la PCR y el agrupamiento de amplicones de distintas muestras y objetivos (generados a partir de otros kits de ensayo LymphoTrack Dx para Ion S5 o Ion PGM) en las matrices de secuenciación del Ion S5 o PGM, lo que da lugar a 12 muestras por objetivo para el análisis en paralelo y de una sola vez.

Por otro lado, el software LymphoTrack Dx para S5/PGM interpreta directamente los datos generados con el kit de ensayo LymphoTrack Dx a través de un sencillo método de análisis y visualización. Siga las instrucciones que figuran en el apartado 11: *Interpretación y elaboración* de informes para interpretar con facilidad los resultados de la muestra en función de la presencia o ausencia de clonalidad e hipermutación somática. **Interprete los resultados de las pruebas de clonalidad molecular en el contexto de los datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos disponibles.**

El kit incluye controles positivos y negativos de clonalidad. Además, se ofrece un control positivo de hipermutación somática opcional, que se puede adquirir por separado ([REF](#) 40880008).

Nota: para conocer mejor el locus y la estrategia de secuenciación dirigida, consulte Miller, J. E. 2013.

3. Principios del procedimiento

3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las pruebas basadas en la PCR se usan de forma habitual para identificar poblaciones clonales de linfocitos B y T. Estas pruebas amplifican el ADN entre cebadores dirigidos al marco de las zonas de preservación V y J de los genes del receptor de antígenos. Los cebadores se dirigen a zonas de preservación que se encuentran a ambos lados de la zona en la que se producen los reordenamientos genéticos programados durante la maduración de los linfocitos B y T. Como consecuencia de estos reordenamientos genéticos, se producen diferentes poblaciones de linfocitos B y T.

Los genes del receptor de antígenos sujetos a reordenamiento son cadenas pesadas de inmunoglobulina (*IGH*), locus de cadenas ligeras (*IGK* e *IGL*) en linfocitos B y locus de los genes del receptor de linfocitos T (*TRA*, *TRB*, *TRG* y *TRD*) en los linfocitos T. Cada linfocito B y T presenta uno o dos reordenamientos V-J productivos, únicos en longitud y en secuencia. Por lo tanto, cuando el ADN de una población normal o policlonal se amplifica por medio de cebadores de ADN que flanquean la región V-J, se generan amplicones únicos tanto en secuencia como en longitud, lo que se traduce en una población heterogénea. En caso de ausencia del ADN de los linfocitos, no se generan amplicones. Las muestras que contienen poblaciones clonales de *IGH* generan uno o dos productos amplificados prominentes de la misma longitud y secuencia que los que se detectan a una frecuencia significativa y en un fondo policlonal disminuido.

3.2. Purificación de amplicones

Los amplicones derivados de la PCR se purifican por medio de microesferas paramagnéticas de inmovilización reversible de la fase sólida (SPRI), que eliminan el exceso de cebadores, nucleótidos, sales y enzimas. Los amplicones derivados de la PCR, que contienen un mínimo de 100 pb, se fijan a las microesferas paramagnéticas gracias al uso de un amortiguador optimizado, mientras que los contaminantes —exceso de cebadores, dímeros de los cebadores, sales y dNTP no incorporados— se eliminan por lavado. A continuación, los amplicones se eluyen y separan de las microesferas paramagnéticas, lo que da lugar a un producto de la PCR más purificado para el análisis gen abajo y la cuantificación de amplicones.

3.3. Cuantificación de amplicones

Los amplicones purificados se cuantifican mediante electroforesis capilar, que se basa en el principio de la tradicional electroforesis en gel para separar y cuantificar el ADN en plataformas con matrices de secuenciación. Para la cuantificación, se incorpora un marcador de una concentración conocida a los amplicones derivados de la PCR; a continuación, se extrapola la concentración de los amplicones. El cálculo de la concentración de los amplicones derivados de la PCR posibilita la representación de todos los amplicones en la genoteca que se carga en el cartucho del Ion S5 o en la matriz de secuenciación del Ion PGM para la secuenciación.

3.4. Secuenciación de nueva generación (SNG)

Los métodos de secuenciación de Sanger son los más habituales en las tecnologías de secuenciación de ácido nucleico de “primera generación”. Los métodos más novedosos, que se valen de enfoques de secuenciación masiva en paralelo, se conocen como SNG. Estas tecnologías usan distintas estrategias de preparación, secuenciación, obtención de imágenes y bioinformática para la alineación y el ensamblaje del genoma.

Las tecnologías de SNG que se usan con este kit de ensayo se basan en la amplificación de secuencias genéticas que utilizan una serie de cebadores directos e inversos con etiquetas índice y de adaptación. Los amplicones generados a través de las mezclas maestras LymphoTrack Dx se cuantifican, combinan y cargan en una matriz para su secuenciación por medio de las plataformas Ion S5 o Ion PGM de Thermo Fisher Scientific. En estas plataformas, la genoteca de fragmentos de ADN debe fijarse a las microesferas específicas antes de la secuenciación (una secuencia por cada microesfera). Una vez fijados a las microesferas, los fragmentos de ADN se amplifican mediante PCR en emulsión hasta que cubren toda la superficie de la microesfera. Las microesferas se cargan en una matriz de semiconducción que cuenta con un pocillo por microesfera antes de proceder con la secuenciación.

Para realizar la secuenciación, se llena la matriz de nucleótidos no incorporados base por base (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Los instrumentos de secuenciación detectan la incorporación de nucleótidos tras la liberación de iones de hidrógeno durante la polimerización del ADN, lo que provoca un cambio en el pH de los pocillos, que se refleja a modo de cambio de tensión. La tensión cambia de forma directamente proporcional al número de nucleótidos incorporado.

Tras la incorporación de los nucleótidos, se eliminan por lavado los nucleótidos no incorporados y se reinicia el proceso con un dNTP nuevo.

3.5. Multiplicación de amplicones

Estos productos se diseñaron para permitir dos niveles de multiplicación distintos, con el propósito de reducir costes y ahorrar tiempo a los laboratorios. El primer nivel de multiplicación guarda relación con los índices que se suministran con los kits de ensayo (hasta 12). Cada uno de estos 12 índices puede actuar a modo de código de barras único y permite que los amplicones derivados de las muestras individuales se agrupen tras la amplificación por PCR a fin de generar la genoteca de secuenciación. Las secuencias resultantes se ordenan por medio de un software de bioinformática para identificar aquellas secuencias derivadas de una muestra concreta.

El segundo nivel de multiplicación guarda relación con la capacidad del software para ordenar los datos de secuenciación por índice y diana. Esto permite que los amplicones generados con cebadores específicos (incluso aquellos marcados con el mismo índice) se agrupen en una sola genoteca que se secuenciará en una sola matriz de secuenciación. Cabe señalar, a modo de ejemplo, la secuenciación de productos de varios kits de ensayo LymphoTrack Dx de Invivoscribe en una misma serie. De cualquier modo, es importante generar un número suficiente de lecturas para la interpretación válida de cada muestra.

Vista la capacidad de la matriz Ion 316™ v2 BC para el Ion PGM de Thermo Fisher Scientific, que genera 2-3 millones de lecturas, se recomienda multiplicar un máximo de tres dianas genéticas distintas, como *IGH* FR1, *IGH* FR2 y *IGH* FR3, de forma simultánea. Las siguientes matrices permiten multiplicar hasta cinco dianas genéticas distintas: matriz para Ion 318™ v2 BC del Ion PGM (4-5,5 millones de lecturas), matriz para Ion 520™ del Ion S5 (3-6 millones de lecturas) y matriz Ion 530 del Ion S5 (15-20 millones de lecturas).

Es importante usar la bioquímica de secuenciación apropiada cuando se multiplican amplicones de diferentes dianas genéticas. El número de ciclos de secuenciación debe ser suficiente para secuenciar el amplicón de mayor tamaño del múltiplo. También pueden multiplicarse en una misma genoteca de secuenciación dos o más genotecas de secuenciación generadas a partir de ciertas mezclas maestras de los genes diana LymphoTrack (*p. ej.*, dos genotecas de secuenciación de *IGH* FR1 del mismo o de diferentes lotes), siempre que los índices de dicha mezcla maestra solo se incluyan una vez por serie.

3.6. Evaluación de la hipermutación somática (HS) de IGHV

Para la evaluación de la tasa de hipermutación somática en la región *IGHV*, pueden utilizarse las mezclas maestras del LymphoTrack Dx *IGH* FR1. No obstante, estas solo se dirigen a una porción de la región *IGHV*, por lo que no se evaluará la secuencia cadena arriba del punto de fijación del cebador. Tras el análisis del estado de hipermutación somática, el software de bioinformática indicará la tasa de mutación en función del porcentaje de discordancia entre amplicones clonales y genes de referencia de la estirpe germinal; una predicción de si la proteína se ajustará o no al marco; una predicción de si las mutaciones o reordenamientos génicos darán lugar a un codón de terminación prematuro; y el porcentaje de cobertura del gen V_H en la región diana.

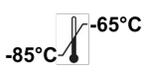
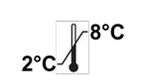
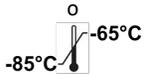
4. Reactivos

4.1. Componentes de los reactivos

Tabla 1. Kits disponibles

Núm. cat.	Descripción	Núm. mezclas maestras indexadas	Reacciones totales
REF 91210007	Kit de ensayo LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR1 para S5/PGM	12 índices 5 series de secuenciación	60
REF 91210037	Kit de ensayo LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR2 para S5/PGM	12 índices 5 series de secuenciación	60
REF 91210047	Kit de ensayo LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR3 para S5/PGM	12 índices 5 series de secuenciación	60
REF 91210057	Kit de ensayo LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR1/2/3 para S5/PGM	12 índices 5 series de secuenciación	60+60+60

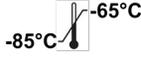
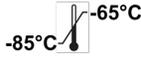
Tabla 2. Componentes del kit de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* FR1

Reactivos	Componentes de los reactivos	Núm. índice	Cant. por unidad	91210007 Núm. de unidades	Temperatura de almacenamiento	Notas				
Mezclas maestras †	<i>IGH</i> FR1 S5/PGM 01	IonXpress_001	250 µl	1		N. P.				
	<i>IGH</i> FR1 S5/PGM 02	IonXpress_002		1						
	<i>IGH</i> FR1 S5/PGM 03	IonXpress_003		1						
	<i>IGH</i> FR1 S5/PGM 04	IonXpress_004		1						
	<i>IGH</i> FR1 S5/PGM 07	IonXpress_007		1						
	<i>IGH</i> FR1 S5/PGM 08	IonXpress_008		1						
	<i>IGH</i> FR1 S5/PGM 09	IonXpress_009		1						
	<i>IGH</i> FR1 S5/PGM 10	IonXpress_010		1						
	<i>IGH</i> FR1 S5/PGM 11	IonXpress_011		1						
	<i>IGH</i> FR1 S5/PGM 12	IonXpress_012		1						
	<i>IGH</i> FR1 S5/PGM 13	IonXpress_013		1						
	<i>IGH</i> FR1 S5/PGM 14	IonXpress_014		1						
	ADN de control positivo	<i>IGH</i> POS (+) REF 40880009)		N. P.			45 µl	2		<i>IGH</i> V1-46_03/ <i>IGH</i> J4_02 en ADN de la amígdala
	ADN de control negativo	NEG (-) en la SNG REF 40920018)		N. P.			45 µl	2		ADN de la amígdala; la frecuencia secuencial más alta puede variar entre lotes

Nota: No se usan conservantes en la fabricación de estos kits.

†Nota: Este kit no usa los índices IonXpress 5 y 6.

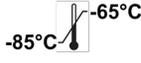
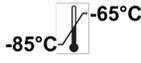
Tabla 3. Componentes del kit de ensayo LymphoTrack Dx IGH FR2

Reactivos	Componentes de los reactivos	Núm. índice	Cant. por unidad	91210037 Núm. de unidades	Temperatura de almacenamiento	Notas
Mezclas maestras †	IGH FR2 S5/PGM 01	IonXpress_001	250 µl	1		N. P.
	IGH FR2 S5/PGM 02	IonXpress_002		1		
	IGH FR2 S5/PGM 03	IonXpress_003		1		
	IGH FR2 S5/PGM 04	IonXpress_004		1		
	IGH FR2 S5/PGM 07	IonXpress_007		1		
	IGH FR2 S5/PGM 08	IonXpress_008		1		
	IGH FR2 S5/PGM 09	IonXpress_009		1		
	IGH FR2 S5/PGM 10	IonXpress_010		1		
	IGH FR2 S5/PGM 11	IonXpress_011		1		
	IGH FR2 S5/PGM 12	IonXpress_012		1		
	IGH FR2 S5/PGM 13	IonXpress_013		1		
	IGH FR2 S5/PGM 14	IonXpress_014		1		
	ADN de control positivo	IGH POS (+) (REF 40880009)		N. P.		
ADN de control negativo	NEG (-) en la SNG (REF 40920018)	N. P.	45 µl	2		ADN de la amígdala; la frecuencia secuencial más alta puede variar entre lotes

Nota: No se usan conservantes en la fabricación de estos kits.

†Nota: Este kit no usa los índices IonXpress 5 y 6.

Tabla 4. Componentes del kit de ensayo LymphoTrack Dx IGH FR3

Reactivos	Componentes de los reactivos	Núm. índice	Cant. por unidad	91210047 Núm. de unidades	Temperatura de almacenamiento	Notas
Mezclas maestras †	IGH FR3 S5/PGM 01	IonXpress_001	250 µl	1		N. P.
	IGH FR3 S5/PGM 02	IonXpress_002		1		
	IGH FR3 S5/PGM 03	IonXpress_003		1		
	IGH FR3 S5/PGM 04	IonXpress_004		1		
	IGH FR3 S5/PGM 07	IonXpress_007		1		
	IGH FR3 S5/PGM 08	IonXpress_008		1		
	IGH FR3 S5/PGM 09	IonXpress_009		1		
	IGH FR3 S5/PGM 10	IonXpress_010		1		
	IGH FR3 S5/PGM 11	IonXpress_011		1		
	IGH FR3 S5/PGM 12	IonXpress_012		1		
	IGH FR3 S5/PGM 13	IonXpress_013		1		
	IGH FR3 S5/PGM 14	IonXpress_014		1		
	ADN de control positivo	IGH POS (+) (REF 40880009)		N. P.		
ADN de control negativo	NEG (-) en la SNG (REF 40920018)	N. P.	45 µl	2		ADN de la amígdala; la frecuencia secuencial más alta puede variar entre lotes

Nota: No se usan conservantes en la fabricación de estos kits.

†Nota: Este kit no usa los índices IonXpress 5 y 6.

Tabla 5. Componentes del kit de ensayo LymphoTrack Dx IGH FR1/2/3

Mezclas maestras para FR1 [‡]	Número de unidades	Mezclas maestras para FR2 [‡]	Número de unidades	Mezclas maestras para FR3 [‡]	Número de unidades	Núm. índice	Cant. por unidad
IGH FR1 S5/PGM 01	1	IGH FR2 S5/PGM 01	1	IGH FR3 S5/PGM 01	1	lonXpress_001	250 µl
IGH FR1 S5/PGM 02	1	IGH FR2 S5/PGM 02	1	IGH FR3 S5/PGM 02	1	lonXpress_002	
IGH FR1 S5/PGM 03	1	IGH FR2 S5/PGM 03	1	IGH FR3 S5/PGM 03	1	lonXpress_003	
IGH FR1 S5/PGM 04	1	IGH FR2 S5/PGM 04	1	IGH FR3 S5/PGM 04	1	lonXpress_004	
IGH FR1 S5/PGM 07	1	IGH FR2 S5/PGM 07	1	IGH FR3 S5/PGM 07	1	lonXpress_007	
IGH FR1 S5/PGM 08	1	IGH FR2 S5/PGM 08	1	IGH FR3 S5/PGM 08	1	lonXpress_008	
IGH FR1 S5/PGM 09	1	IGH FR2 S5/PGM 09	1	IGH FR3 S5/PGM 09	1	lonXpress_009	
IGH FR1 S5/PGM 10	1	IGH FR2 S5/PGM 10	1	IGH FR3 S5/PGM 10	1	lonXpress_010	
IGH FR1 S5/PGM 11	1	IGH FR2 S5/PGM 11	1	IGH FR3 S5/PGM 11	1	lonXpress_011	
IGH FR1 S5/PGM 12	1	IGH FR2 S5/PGM 12	1	IGH FR3 S5/PGM 12	1	lonXpress_012	
IGH FR1 S5/PGM 13	1	IGH FR2 S5/PGM 13	1	IGH FR3 S5/PGM 13	1	lonXpress_013	
IGH FR1 S5/PGM 14	1	IGH FR2 S5/PGM 14	1	IGH FR3 S5/PGM 14	1	lonXpress_014	
Reactivos	Componentes de los reactivos			Notas	Número de unidades	Cant. por unidad	
ADN de control positivo*	IGH POS (+) (REF 40880009)			IGH V1-46_03/IGH J4_02 en ADN de la amígdala	4	45 µl	
ADN de control negativo*	NEG (-) en la SNG (REF 40920018)			ADN de la amígdala; la frecuencia secuencial más alta puede variar entre lotes	4	45 µl	

*Nota: La temperatura de conservación de las mezclas maestras es de entre -85°C y -65°C.

*Nota: La temperatura de conservación de los controles es de entre 2°C y 8°C o de entre -85°C y -65°C.

Nota: No se usan conservantes en la fabricación de estos kits.

*Nota: Este kit no usa los índices lonXpress 5 y 6.

4.2. Advertencias y precauciones



Lea atentamente las instrucciones de uso antes de comenzar el procedimiento de ensayo y siga cada paso atentamente.

- **IVD** Producto para uso de diagnóstico *in vitro*.
- Utilice este kit de análisis a modo de sistema. No utilice los 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 marcada cuando se almacenan y manipulan según las instrucciones. No utilice los kits después de su fecha de caducidad.
- El cumplimiento del protocolo garantizará 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.
- Elimine los reactivos no utilizados y los residuos de acuerdo con las regulaciones nacionales, federales, estatales y locales.
- Utilice equipos de protección personal estándar (guantes, batas de laboratorio y gafas protectoras) para realizar las tareas de laboratorio. Siga las prácticas óptimas de laboratorio y tome las precauciones necesarias cuando trabaje con muestras. No pipetee con la boca. No coma, beba ni fume en las zonas de trabajo del laboratorio. Lávese bien las manos después de manipular las muestras y los reactivos del kit de ensayo. 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 pruebas de gran 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. Use puntas de pipeta nuevas, resistentes a aerosoles, entre las muestras y entre los reactivos de dispensación. Todos los reactivos deben controlarse con atención para detectar signos de contaminación (*por ejemplo*, controles negativos que den señales positivas). Elimine cualquier reactivo que pueda haberse contaminado.
- Para reducir al mínimo las posibilidades de contaminación, use guantes para manipular las muestras y los reactivos y limpie las zonas de trabajo y las pipetas antes de configurar la PCR.
- 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. El autoclave no elimina la contaminación del ADN. Realice las tareas previas y posteriores a la PCR en espacios separados. Evite llevar papel y otros materiales del espacio dedicado a las tareas previas a la PCR al espacio dedicado a las tareas posteriores.
- Las pipetas, puntas de pipetas y cualquier otro instrumento utilizado en una zona específica deben ser de uso exclusivo de dicha zona.
- Descontamine los artículos no desechables en lejía al 10 % y aclárelos con agua destilada dos veces por separado antes de devolverlos a las áreas de inicio.
- Siempre que sea posible, utilice material plástico estéril desechable para evitar la contaminación.

4.3. Almacenamiento y manipulación

- Almacene el kit de ensayo a entre **-85°C y -65°C** hasta que vaya a usarlo.
- La temperatura de conservación óptima para el material de referencia del ADN es de entre 2°C y 8°C, pero también se puede almacenar 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.
- Debido a las altas concentraciones de sal, las mezclas maestras de PCR son sensibles a los ciclos de congelación/descongelación. Limite el número de ciclos a un máximo de cinco.

Si tiene alguna duda, póngase en contacto con el personal técnico de Invivoscribe. Estaremos encantados de ayudarle con cualquier duda de conservación.

5. Instrumental

El instrumental que se recoge en la Tabla 6 debería usarse con las siguientes combinaciones validadas para la preparación de la genoteca y la secuenciación de los kits de ensayo LymphoTrack *IGH* (FR1/FR2/FR3) para S5/PGM:

- Ion Chef™ e Ion S5
- Ion OneTouch 2™ (OT2) e Ion S5
- Ion OT2 e Ion PGM

Tabla 6. Instrumentos recomendados.

Función del instrumento	Combinación de plataformas validada e instrumentos/especificaciones recomendados		
	Ion Chef e Ion S5	Ion OT2 e Ion S5	Ion OT2 e Ion PGM
Amplificación de muestras de ADN	<p>Termociclador Veriti™* o equivalente Intervalo térmico mínimo: 15-96°C Velocidad de aceleración mínima: 0,8°C/s</p> <p>Consulte el apartado 7.4. <i>Amplificación</i> para conocer el programa del termociclador.</p>		
Purificación de productos para PCR	<p>Soporte magnético 96* de Ambion® (REF AM10027) Superplaca magnética con anillo 96 de Agencourt SPRI Plate® o equivalente* (REF A32782) Imán con faldón lateral DynaMag™-96 de Thermo Fisher Scientific* (REF 12027) o equivalente</p> <p>Consulte el apartado 7.5. <i>Purificación con AMPure XP</i> para conocer los métodos de purificación de los productos para PCR.</p>		
Cuantificación de productos para PCR purificados	<p>Bioanalizador Agilent 2100* o LabChip GX de Perkin Elmer*</p> <p>Consulte el apartado 7.6. <i>Cuantificación de amplicones</i> para saber más.</p>		
Preparación de la plantilla	<p>Sistema Ion Chef de Thermo Fisher Scientific*</p> <p>Consulte el apartado 7.9. <i>Preparación de la plantilla y secuenciación con los sistemas Ion Chef e Ion S5</i> para saber más.</p>	<p>Sistema Ion OT2 de Thermo Fisher Scientific*</p> <p>Consulte el apartado 7.10. <i>Preparación de la plantilla y secuenciación con los sistemas Ion OT2 e Ion S5</i> para saber más.</p>	<p>Sistema Ion OT2 de Thermo Fisher Scientific*</p> <p>Consulte el apartado 7.11. <i>Preparación de la plantilla y secuenciación con los sistemas Ion OT2 e Ion PGM</i> para saber más.</p>
Secuenciación	<p>Sistema Ion S5 de Thermo Fisher Scientific*</p> <p>Consulte los apartados 7.9. <i>Preparación de la plantilla y secuenciación con los sistemas Ion Chef e Ion S5</i> y 7.10. <i>Preparación de la plantilla y secuenciación con los sistemas Ion OT2 e Ion S5</i> para saber más.</p>		<p>Sistema Ion PGM de Thermo Fisher Scientific*</p> <p>Consulte el apartado 7.11. <i>Preparación de la plantilla y secuenciación con los sistemas Ion OT2 e Ion PGM</i> para saber más.</p>

Nota: Siga las instrucciones de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante.

* Advertencia: estos productos no contienen el marcado CE.

6. Recogida y preparación de las muestras

6.1. Precauciones

Las muestras biológicas procedentes de seres humanos pueden contener materiales potencialmente infecciosos. Manipule las muestras de acuerdo con el programa sobre patógenos de transmisión hemática de su centro y de acuerdo con un nivel de bioseguridad 2.

6.2. Sustancias que pueden interferir

Las siguientes sustancias pueden interferir con la PCR:

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

6.3. Requisitos y manipulación de las muestras

- El aporte mínimo es de 50 ng de ADN de primera calidad (5 µl de ADN de la muestra en una concentración mínima de 10 ng/µl).
- Este kit de ensayo analiza ADN genómico extraído y purificado. El ADN debe cuantificarse de acuerdo con un método específico para el ADN bicatenario (ADNbc) y debe estar exento de inhibidores de amplificación de la PCR.
- Resuspenda el ADN en una solución del tipo TE 0,1X (Tris-HCl 1 mm, EDTA 0,1 mm, pH 8,0, preparada con agua para uso en biología molecular) o en agua para uso en biología molecular.

6.4. Almacenamiento de la muestra

El método de conservación de las muestras debe garantizar la ausencia de degradación del ADN.

7. Procedimiento de ensayo

7.1. Materiales suministrados

Consulte las Tabla 2 y Tabla 5 para saber qué materiales se suministran.

7.2. Materiales necesarios no suministrados

Tabla 7. Materiales necesarios no suministrados

Reactivo/Material	Reactivo o proveedor obligatorio o recomendable	Número de catálogo	Notas
ADN polimerasa	Roche: <ul style="list-style-type: none"> ADN polimerasas EagleTaq™ Invioscribe, Inc.: <ul style="list-style-type: none"> FalconTaq DNA Polymerase o equivalente 	05206944190 60970130	5 U/μl
Agua para uso en biología molecular	N. P.	N. P.	Exenta de DNasa y RNasa
Agua (18 MΩ)	N. P.	N. P.	Obligatoria para el uso de PGM
Pipetas calibradas	N. P.	N. P.	Debe ser capaz de medir con precisión volúmenes de entre 0,2 μl y 1000 μl
Agitador vorticial	N. P.	N. P.	N. P.
Placas o tubos de PCR	N. P.	N. P.	N. P.
Puntas de pipeta con barrera de filtro	N. P.	N. P.	Estéres y exentas de RNasa, DNasa y pirógenos
Tubos para microcentrífuga	N. P.	N. P.	Estéres
Kit de purificación para PCR	Beckman Coulter®, Inc: <ul style="list-style-type: none"> AMPure XP de Agencourt 	A63880	N. P.
Control positivo	Invioscribe, Inc.	40880008	Opcional, para la prueba de HS
Cuantificación de amplicones y genoteca	Agilent Technologies: <ul style="list-style-type: none"> DNA 1000 Kit de Agilent o Perkin Elmer: <ul style="list-style-type: none"> Reactivos HT DNA 1K/12K/Hi Sens Labchip y HT DNA HiSens 	5067-1504 760517 y CLS760672	N. P.
Secuenciación con Ion S5	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Kits Ion 520 e Ion 530: OT2 o <ul style="list-style-type: none"> Kits Ion 510, Ion 520 e Ion 530: Chef 	A27751 A34019	N. P.
	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Matriz para Ion 520 o <ul style="list-style-type: none"> Matriz para Ion 530 	A27761 A27764	N. P.
Secuenciación con Ion PGM	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Kit Ion PGM Hi-Q View OT2 	A29900	N. P.
	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Microesferas para Ion PGM 	4478525	N. P.
	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Kit de secuenciación Ion PGM Hi-Q View y kit de frascos Ion PGM Wash 2 	A30044 y A25591	N. P.
	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Matriz para Ion 318 v2 BC o <ul style="list-style-type: none"> Matriz para Ion 318 v2 BC 	4488149 4488146	N. P.

Tabla 7. Materiales necesarios no suministrados

Reactivo/Material	Reactivo o proveedor obligatorio o recomendable	Número de catálogo	Notas
Software Torrent Suite™ para el sistema Ion PGM o el sistema Ion S5	Versión 5.0.4 o 5.2.2 para el PGM* o Versión 5.6 para el S5*	N. P.	N. P.

*Nota: Se usaron estas versiones del software en los ensayos de validación del instrumental especificado.

7.3. Preparación de los reactivos

Para asegurarse de que las muestras de ADN no contengan inhibidores de la PCR y sean suficientes —tanto en calidad como en cantidad— como para generar un resultado válido, analícelas con la mezcla maestra Specimen Control Size Ladder de Invivoscribe (REF 20960021 [ABI] o REF 20960020 [gel]). Este producto apunta a numerosos genes con el propósito de generar una serie de amplicones de en torno a 100, 200, 300, 400 y 600 pb; el tamaño puede variar +/- 5 pb debido al estándar de tamaño y/o a las diferencias entre instrumentos. La verificación de la integridad del ADN es especialmente importante para muestras difíciles, como los tejidos FFIP.

Utilice los controles positivo y negativo para garantizar que el análisis se haya realizado correctamente. **Configure un control en blanco (CB)** para asegurarse de que no haya contaminación durante el proceso de configuración de la PCR.

- 7.3.1. Póngase los guantes para sacar las mezclas maestras del congelador. Deje que los tubos se descongelen. A continuación, mézclelos suavemente en el agitador vorticial y centrifugue.
- 7.3.2. Encienda la campana de extracción o la cabina para PCR y pipetee 45 µl de cada tubo de mezcla maestra a una placa para PCR limpia (un pocillo por mezcla maestra y una mezcla maestra por muestra).
 - Incorpore dos controles a cada serie (uno positivo y uno negativo) y un CB.
 - Por lo que respecta al CB, use agua para uso en biología molecular y no ADN.
- 7.3.3. Añada 0,2 µl de ADN polimerasa Taq (5 U/µl) a los pocillos que contengan las alícuotas de las mezclas maestras.
- 7.3.4. Añada 5 µl de la muestra de ADN (en una concentración mínima de 10 ng/µl), ADN de control o agua para uso en biología molecular (CB) a los pocillos que contengan las reacciones de la mezcla maestra.
 - Pipetee arriba y abajo de 5 a 10 veces para mezclar.
 - Cierre la placa, centrifugue e introdúzcala en el termociclador de PCR.

Tabla 8. Configuración de la reacción

Reactivo	Volumen
Mezcla maestra	45,0 µl
ADN polimerasa Taq	0,2 µl
Muestra o ADN de control	5,0 µl
Total	50,2 µl

7.4. Amplificación

- 7.4.1. Amplifique las muestras a través del protocolo para PCR que figura en la Tabla 9.

Tabla 9. Protocolo para PCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclo
1	95°C	7 minutos	1
2	95°C	45 segundos	29x
3	60°C	45 segundos	
4	72°C	90 segundos	
5	72°C	10 minutos	1
6	15 °C	∞	1

- 7.4.2. Cuando el programa de amplificación termine, extraiga la placa para PCR del termociclador. Si no va a continuar con el proceso de inmediato, conserve los productos de la PCR a 4°C durante 1 día.

7.5. Purificación con AMPure XP

La purificación de los productos de la PCR —derivados de las muestras y los controles positivos, negativos o en blanco— se realizó a través del sistema de purificación para PCR AMPure XP de Agencourt.

Preparación:

- 7.5.1. Extraiga el reactivo AMPure XP del espacio de conservación y deje que se ajuste a la temperatura ambiente antes de usarlo. Agite suavemente el frasco AMPure XP de Agencourt para resuspender las partículas magnéticas que puedan haberse asentado.
- 7.5.2. Transfiera el volumen necesario del reactivo AMPure XP de Agencourt a un tubo de 2 ml nuevo para reducir al mínimo el riesgo de contaminación por medio de las puntas de la pipeta.
 - Volumen necesario del reactivo AMPure XP de Agencourt = $n \times 90 \mu\text{l}$ (siendo n el número de muestras por purificar).
- 7.5.3. Prepare una solución matriz (0,5 ml por cada muestra por purificar) de etanol al 70 % y agua estéril.

Fijación de amplicones a partículas magnéticas:

- 7.5.4. Añada 90 μl de las alícuotas del reactivo AMPure XP de Agencourt a **temperatura ambiente** a cada muestra por purificar.
 - Pipetee arriba y abajo 10 veces para mezclar.
 - El color de la mezcla debe ser homogéneo tras la mezcla.
 - Incube 5 minutos a temperatura ambiente.
- 7.5.5. Coloque las muestras ya mezcladas en el soporte magnético 96 de Ambion e incube a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir que las partículas magnéticas se separen de la solución.
 - No retire la placa del soporte magnético en ningún momento a lo largo del procedimiento hasta llegar al apartado 7.5.10
- 7.5.6. Utilice una pipeta P200 (o una pipeta multicanal similar) ajustada en 135 μl para aspirar el sobrenadante y deséchelo.
 - Utilice una pipeta P10 (o una pipeta multicanal similar) ajustada en 10 μl para eliminar cualquier exceso de sobrenadante.
 - No elimine las partículas magnéticas.

Lavado:

- 7.5.7. Sin retirar la placa del soporte magnético, añada 200 μl de etanol al 70 % a cada muestra. Incube durante 30 segundos a temperatura ambiente.
 - Utilice una pipeta P200 (o una pipeta multicanal similar) ajustada en 195 μl para aspirar el etanol y deséchelo.
 - Utilice una pipeta P10 (o una pipeta multicanal similar) ajustada en 10 μl para eliminar el exceso de etanol.
 - No elimine las partículas magnéticas.
- 7.5.8. Repita las instrucciones que figuran en el apartado 7.5.7 hasta completar dos lavados.
- 7.5.9. Asegúrese de no retirar la placa del soporte magnético y deje que las partículas magnéticas se sequen al aire durante 5 minutos.

Elución:

- 7.5.10. Retire la placa del soporte magnético. Añada 40 μl de la solución amortiguadora 1X TE.
 - Mezcle con la pipeta hasta obtener una mezcla homogénea.
 - Asegúrese de que todas las partículas magnéticas estén en solución.
- 7.5.11. Incube a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 7.5.12. Coloque la placa sobre el soporte magnético durante al menos 5 minutos o hasta que el sobrenadante haya desaparecido.

- 7.5.13. Transfiera 35 µl del eluido a una placa nueva y cierre con cintas de sellado. Etiquete la placa y centrifugue brevemente para asegurarse de que el sobrenadante se haya asentado completamente en el fondo del pocillo.
- Conserve a -20°C o proceda con el siguiente apartado.

Las imágenes de las Figura 1-3 indican la eficacia de la purificación habitual (muestra los amplicones antes y después de la purificación) a través de las mezclas maestras de *IGH* FR1, *IGH* FR2 e *IGH* FR3.

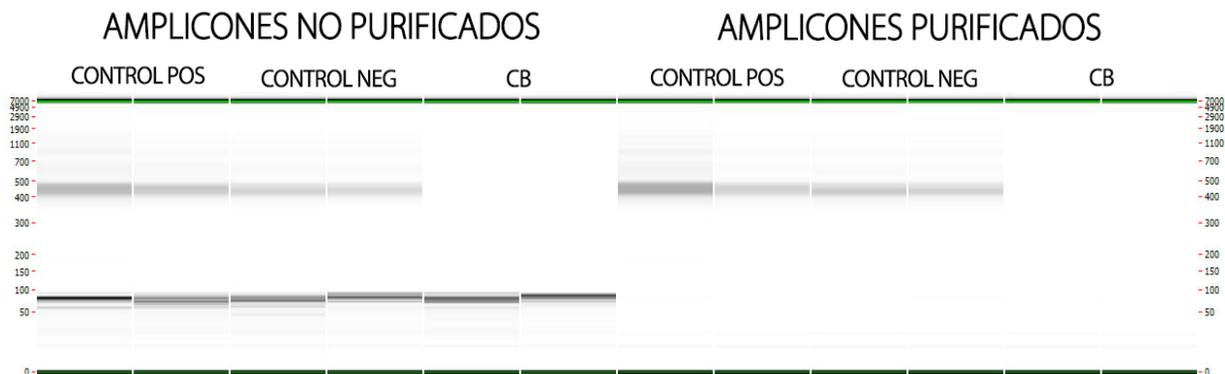


Figura 1: Ejemplo de resultado de la purificación de amplicones derivados de la mezcla maestra del **LymphoTrack Dx IGH FR1**. La imagen se generó tras el uso de productos no purificados y purificados en LabChip GX.

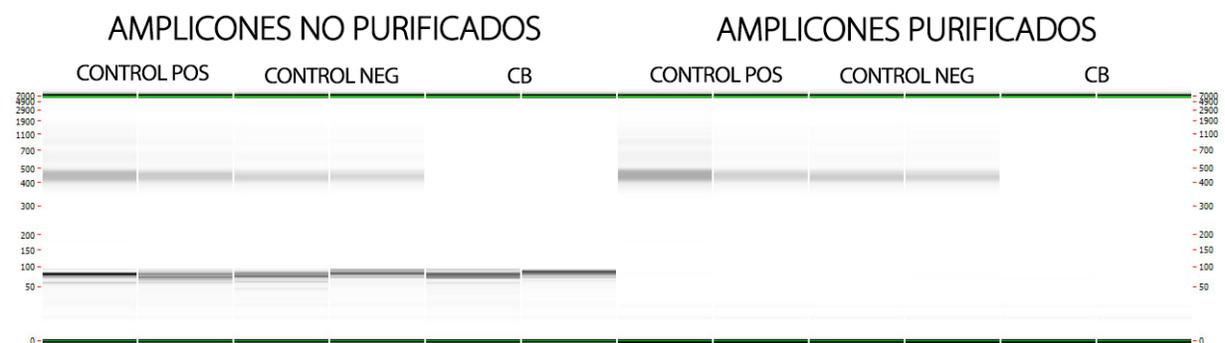


Figura 2: Ejemplo de resultado de la purificación de amplicones derivados de la mezcla maestra del **LymphoTrack Dx IGH FR2**. La imagen se generó tras el uso de productos no purificados y purificados en LabChip GX.

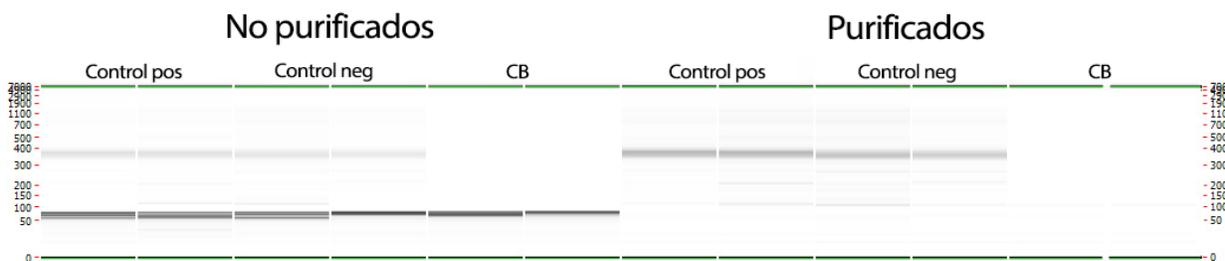


Figura 3: Ejemplo de resultado de la purificación de amplicones derivados de la mezcla maestra del **LymphoTrack Dx IGH FR3**. La imagen se generó tras el uso de productos no purificados y purificados en LabChip GX.

7.6. Cuantificación de amplicones

Como parte del proceso de validación de la prueba y análisis de los datos generados a través de las muestras y los controles positivos, negativos y en blanco, se siguieron las siguientes instrucciones para analizar datos con el bioanalizador Agilent 2100 (a partir del punto 7.6.1) o con el LabChip GX de Perkin Elmer (a partir del punto 7.6.3).

Si va a cuantificar amplicones de PCR purificados procedentes de distintos kits de ensayo LymphoTrack Dx, asegúrese de analizar cada diana por separado (marcos incluidos) pues el intervalo de tamaño de las dianas varía con cada kit.

Cuantificación con el bioanalizador Agilent 2100

Prepárese para usar la matriz DNA 1000 de Agilent (consulte las instrucciones del kit DNA 1000 de Agilent para saber más).

Interpretación de resultados:

- 7.6.1. El electroferograma del pocillo se parecerá al electroferograma que se recoge en la Figura 4. Las principales características de una serie satisfactoria son:
- 13 picos para la escalera DNA 1000.
 - Resolución correcta de todos los picos.
 - Punto de inicio plano.
 - Identificación correcta de ambos marcadores.

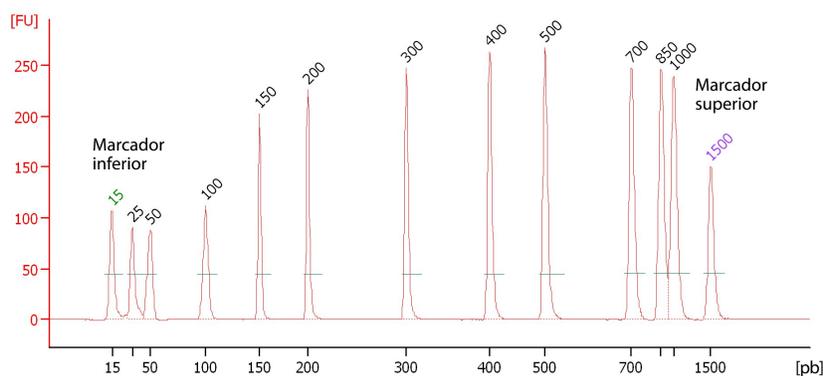


Figura 4: Ejemplo de electroferograma de la escalera con indicación clara de los 13 picos.

- 7.6.2. Determine la molaridad (nmol/l) de cada muestra usando el software del bioanalizador. Si es necesario, proceda con la integración manual y agrupe todos los fragmentos de la genoteca en un mismo pico.

Cuantificación con el LabChip GX de Perkin Elmer

Prepárese para usar la matriz LabChip GX (consulte las instrucciones del LabChip GX de Perkin Elmer para saber más).

Interpretación de resultados:

- 7.6.3. Por defecto, cada vez que realiza un experimento, se guarda un archivo de datos (*.gxd) en una nueva carpeta (el nombre de la carpeta es la fecha actual) a la que se accede desde el acceso directo del escritorio a la carpeta Data (Datos).
- 7.6.4. Transfiera la carpeta que contiene el archivo de datos (*.gxd) al equipo informático.
- 7.6.5. Abra el software del LabChip GX, vaya a la barra de menú y seleccione **File → Import Data (Archivo > Importar datos)** para abrir el archivo de datos que haya transferido (*.gxd).
- 7.6.6. En el cuadrante superior izquierdo de la pantalla, verá un diagrama de la placa. Seleccione los pocillos que usará en el experimento para ver los datos asociados en las tablas de datos que se recogen más abajo. Al seleccionar un pocillo, este se mostrará en color azul.
- 7.6.7. Navegue a la barra de menú y seleccione **Analysis → Analysis Settings (Análisis > Ajustes del análisis)**.
- Seleccione la pestaña **Smear Analysis (Análisis de extensión)** y añada los datos que figuran en las Tabla 10 - Tabla 12.
 - Cuando haya editado todos los datos, haga clic en **Apply (Aplicar)**.
- 7.6.8. Vuelva a la pantalla de inicio, vaya a la barra de menú y seleccione **File → Export (Archivo > Exportar)**.
- 7.6.9. Revise la *Well Chip (tabla de pocillos)* en la ventana emergente (denominada LabChip GX – Export).
- 7.6.10. Haga clic en **OK (Aceptar)** para exportar a un archivo *.csv.
- 7.6.11. Calcule la concentración de amplicones sin diluir. Para ello, multiplique el factor de dilución (50) por la concentración que indique el LabChip GX (nmol/l).

Tabla 10. Ajustes del análisis de extensión con IGH FR1

Tamaño inicial (pb)	Tamaño final (pb)	Color	Nombre	Característica en la tabla de pocillos	Aplicar a los pocillos
350	600	Rojo	Zona [350-600]	Tamaño máximo [pb]	<todos>
350	600	Rojo	Zona [350-600]	Molaridad (nmol/l)	<todos>

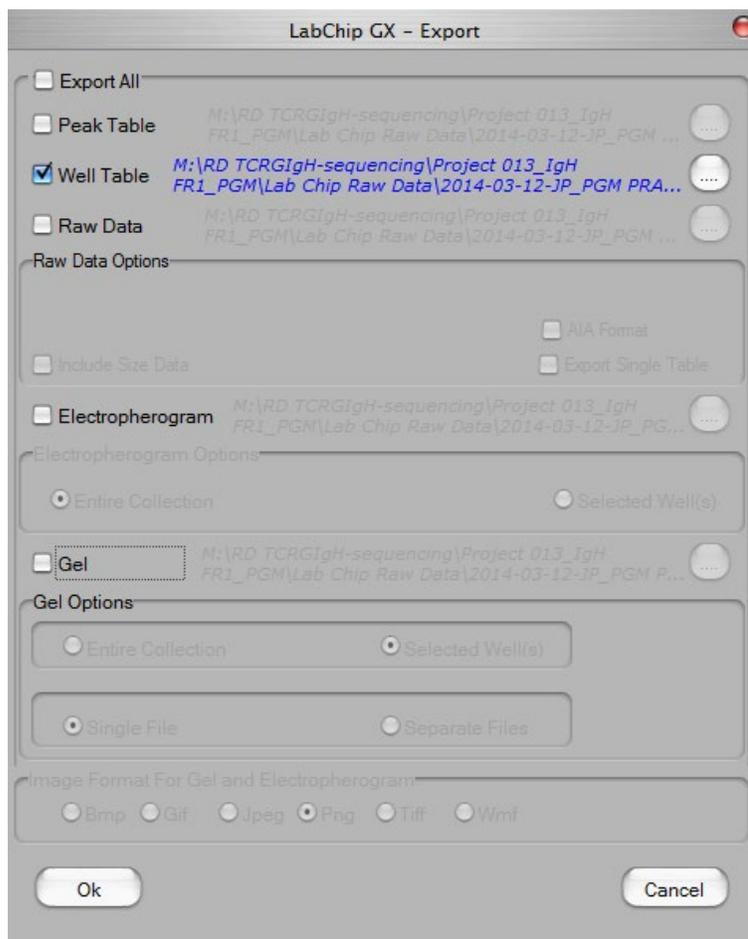
Tabla 11. Ajustes del análisis de extensión con IGH FR2

Tamaño inicial (pb)	Tamaño final (pb)	Color	Nombre	Característica en la tabla de pocillos	Aplicar a los pocillos
300	500	Rojo	Zona [300-500]	Tamaño máximo [pb]	<todos>
300	500	Rojo	Zona [300-500]	Molaridad (nmol/l)	<todos>

Tabla 12. Ajustes del análisis de extensión con IGH FR3

Tamaño inicial (pb)	Tamaño final (pb)	Color	Nombre	Característica en la tabla de pocillos	Aplicar a los pocillos
150	300	Rojo	Zona [150-300]	Tamaño máximo [pb]	<todos>
150	300	Rojo	Zona [150-300]	Molaridad (nmol/l)	<todos>

Figura 5: Ejemplo de ventana emergente LabChip GX – Export (LabChip GX: exportación).



7.7. Agrupación y cuantificación de la genoteca

La cantidad de ADN que se cargue en el sistema de PCR en emulsión del Ion S5 o del Ion PGM es fundamental para generar datos de primera calidad en las series de secuenciación.

Los amplicones que se generen a partir de uno o varios kits de ensayo LymphoTrack Dx podrán agruparse en una genoteca para su secuenciación de acuerdo con las siguientes instrucciones.

- 7.7.1. Añada una **cantidad de amplicones similar** a la concentración que se haya calculado a través del bioanalizador o el LabChip GX (con la excepción del CB).
- *P. ej.*, vierta 4 nm de cada amplicón a un volumen total de 10 µl y use la solución amortiguadora 1X TE como diluyente.
 - Agite con el agitador vorticial el tubo durante 5-15 segundos y centrifugue durante 3-5 segundos.

Si alguna de las muestras presenta una concentración considerablemente inferior o superior a 4 nm, ajuste los volúmenes de la muestra/solución amortiguadora TE de la genoteca y asegúrese de pipetear la misma cantidad de amplicones en cada muestra.

7.8. Dilución del conglomerado de la genoteca

- 7.8.1. Determine el factor de dilución de la plantilla y asegúrese de que el resultado sea de ~20 pm (~12 x 10⁶ moléculas por µl). Para ello, use la siguiente fórmula:

Factor de dilución de la plantilla = (concentración de la genoteca en pm)/20 pm

Ejemplo:

La concentración de la genoteca es de 4 nm (4000 pm)

Factor de dilución de la plantilla = 4000 pm/20 pm = 200

Por lo tanto, la mezcla de 1 µl de la genoteca con 199 µl de la solución amortiguadora 1X TE o del agua exenta de nucleasas que se suministra con el kit Ion PGM Hi-Q View OT2 (dilución 1:200) da lugar a en torno a 20 pm (~12 x 10⁶ moléculas por µl).

Utilice la dilución de la genoteca en un plazo de 48 horas.

7.9. Preparación de la plantilla y secuenciación con los sistemas Ion Chef e Ion S5

Prepare y enriquezca una serie de partículas positivas Ion Sphere. A continuación, secuencie dicha serie en el sistema Ion S5 de acuerdo con la siguiente guía del usuario de Thermo Fisher Scientific:

- Kits Ion 510, Ion 520 e Ion 530: Chef ([REF](#) MAN0016854)

- 7.9.1. Configure una serie programada de acuerdo con lo que se indica en el apartado 7.12.

Todas las instrucciones, incluidas las de instalación, uso, calibración, limpieza y mantenimiento, se ajustan a las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario.

7.10. Preparación de la plantilla y secuenciación con los sistemas Ion OT2 e Ion S5

Prepare y enriquezca una serie de partículas positivas Ion Sphere con el OT2. A continuación, secuencie dicha serie en el sistema Ion S5 de acuerdo con la siguiente guía del usuario de Thermo Fisher Scientific:

- Kits Ion 520 e Ion 530: OT2 ([REF](#) MAN0010844)

- 7.10.1. Configure una serie programada de acuerdo con lo que se indica en el apartado 7.12.

Todas las instrucciones, incluidas las de instalación, uso, calibración, limpieza y mantenimiento, se ajustan a las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario.

7.11. Preparación de la plantilla y secuenciación con los sistemas Ion OT2 e Ion PGM

Prepare y enriquezca una serie de partículas positivas Ion Sphere con el OT2. A continuación, secuencie dicha serie en el sistema Ion PGM de acuerdo con las siguientes guías del usuario de Thermo Fisher Scientific:

- Kit Ion PGM Hi-Q View OT2 (REF MAN0014579)
- Kit de secuenciación Ion PGM Hi-Q View (REF MAN0014583)

Todas las instrucciones, incluidas las de instalación, uso, calibración, limpieza y mantenimiento, se ajustan a las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario.

Nota: no utilice el patrón de calibración del Ion PGM.

7.11.1. Prepare una plantilla con el Ion OT2.

- Seleccione PGM: Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit - 400 en el menú desplegable.

7.11.2. Secuencie la genoteca con el Ion PGM.

- Siga las instrucciones del apartado 7.11.3 para cargar la matriz.
- Configure una serie programada de acuerdo con lo que se indica en el apartado 7.12.

7.11.3. Cargue la matriz del Ion PGM.

Siga estas instrucciones de carga de la matriz para que el proceso sea óptimo.

7.11.3.1. Tras *Chip Check (revisar la matriz)*, prepárese para cargarla de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

7.11.3.2. Tras ajustar la pipeta para la carga de las ISP (~30 µl) en la matriz de secuenciación a una velocidad de ~1 µl por segundo, lleve la matriz a la minicentrífuga y asegúrese de que la pestaña apunte hacia la parte interior (el centro de la minicentrífuga).

- Asegúrese de que la pestaña de la minicentrífuga apunte hacia la parte interior y centrifugue durante 30 segundos. Después, gire dicha pestaña hacia el exterior.

7.11.3.3. Dé 2-3 golpes a la pestaña de la matriz contra la banqueta. Para evitar la formación de burbujas, no extraiga la muestra y vuelva a introducirla en la matriz.

7.11.3.4. Inclíne la matriz unos 45° y extraiga lentamente todo el líquido que pueda desde el puerto de carga. Para ello, tendrá que ajustar la pipeta. Deseche este líquido.

7.11.3.5. Si queda algo de líquido en la matriz, agítela durante 5 segundos con la pestaña apuntando hacia el exterior y extraiga y deseche cualquier resto. No dé vueltas a la matriz.

7.11.3.6. Si queda algo de líquido en la matriz tras agitarla brevemente, golpee suavemente la pestaña de la matriz contra la banqueta varias veces y extraiga y elimine el líquido que se haya acumulado. No tire la matriz por el desagüe. Proceda de inmediato con la selección de la *Planned Run (serie programada)* y la *Performing the Run (ejecución de la serie)* (apartado 7.12).

Nota: para la validación del método, se usaron las guías del usuario de Thermo Fisher Scientific que figuran en el apartado 16 *Referencias*, así como el procedimiento de carga de la matriz. Tras la hibridación del cebador de secuenciación, las reacciones se mantuvieron a 15°C y en el termociclador en lugar de a temperatura ambiente.

Si va a usar la v5.2.2 o v5.6 del software Torrent Suite, siga las instrucciones del *Anexo A: Configurar el complemento FileExporter y cargar los códigos de barras personalizados* para verificar la configuración del complemento *FileExporter* y cargue los códigos de barras personalizados usando el archivo *LymphoTrack_IonXpress.csv* que se incluye en el CD suministrado (REF 9-500-0007). Si va a usar la v5.0.4 del software, continúe con el apartado 7.12.

7.12. Configurar una serie programada

- 7.12.1. Configure una serie programada para el **Ion S5** o **PGM**. Inicie sesión en el navegador Torrent del servidor Torrent al que esté conectado el sistema.
- 7.12.2. Haga clic en la pestaña **Plan (Programar)** y, a continuación, en **Generic Sequencing (Secuenciación genérica)**, dentro de **Templates (Plantillas)**. A continuación, seleccione **Plan New Run (Programar nueva serie)** en el cuadrante superior derecho.
- 7.12.3. Revise todas las opciones del *Plan Run Wizard (asistente de programación de series)* y seleccione las que proceda de acuerdo con la Tabla 13.
- 7.12.4. Seleccione la *Planned Run (serie programada)* y ejecútela.

¡ATENCIÓN! Si va a usar la v5.2.2 o v5.6 del software, póngase en contacto con el servicio técnico de Thermo Fisher, que le ayudará a actualizar los códigos de barras.

Caracteres en el nombre de la muestra:

- Utilice un nombre o identificador único para cada muestra. Si está analizando muestras por duplicado, utilice nombres similares (p. ej., Muestra1a y Muestra1b).
- Si no utiliza nombres exclusivos en las muestras que vaya a analizar en una misma matriz de secuenciación, el software LymphoTrack Dx para S5/PGM combinará numerosas muestras a lo largo de todo el proceso de análisis.
- Es fundamental que los nombres de los archivos contengan únicamente los siguientes caracteres: A-Z, a-z, 0-9, , _ (guion bajo) y - (guion).
- El software puede fallar si detecta caracteres distintos de estos o más de un espacio consecutivo.

Nombre de la muestra al multiplicar:

Los índices solo pueden aparecer una vez en la serie programada. Por lo tanto, el nombre —que figurará en el nombre de archivo FASTQ— debe abarcar todos aquellos datos necesarios para rastrear las muestras secuenciadas con dianas múltiples y un mismo índice.

Se recomienda poder rastrear todas las muestras y dianas de la misma tanda que se hayan secuenciado utilizando el mismo índice con el Ion S5 o el Ion PGM. Seleccione un identificador único para dichas muestras y dianas; deberá introducirlo en el campo Nombre de la muestra de la serie programada.

A continuación, encontrará una serie de ejemplos de nombres que puede utilizar para garantizar el seguimiento:

- S1_FR1_FR2_FR3_IGK (muestra secuenciada con distintos kits de ensayo y el mismo índice).
- S1_FR1_S4_TRG (muestras secuenciadas con distintos kits de ensayo y el mismo índice).
- Pool02_IX002 (Pool 02 hace referencia a todas las muestras/dianas secuenciadas con IonXpress_002).

Índices para la multiplicación:

Tenga en cuenta que los índices 5 y 6 de IonXpress no son aplicables a los kits de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* (FR1, FR2, FR3) ni *TRG* y que los índices 3, 5, 6, 7, y 15 no son aplicables a los kits de ensayo LymphoTrack *IGK* para Ion S5 e Ion PGM.

Tabla 13. Opciones del asistente de programación de series por combinación de plataformas

Opción	Combinación de plataformas validada		
	Ion Chef e Ion S5	OT2 e Ion S5	OT2 e Ion PGM
Ion Reporter	Ion Reporter: ninguno Agrupación de muestras: blanco	Ion Reporter: ninguno Agrupación de muestras: blanco	Ion Reporter: ninguno Agrupación de muestras: blanco
Uso (investigativo)	Uso: ADN Técnica: otra	Uso: ADN Técnica: otra	Uso: ADN Técnica: otra
Kits	Kit de preparación de muestras: deje en blanco	Kit de preparación de muestras: deje en blanco	Kit de preparación de muestras: deje en blanco
	Tipo de kit de la genoteca: deje en blanco	Tipo de kit de la genoteca: deje en blanco	Tipo de kit de la genoteca: deje en blanco
	Kit para plantillas: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Seleccione el instrumento Chef ▪ Kits Ion 510, Ion 520 e Ion 530: Chef 	Kit para plantillas: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Seleccione el instrumento OneTouch ▪ Kits Ion 520 e Ion 530: OT2 	Kit para plantillas: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Seleccione el instrumento OneTouch ▪ Kit Ion PGM Hi-Q View OT2: 400

Tabla 13. Opciones del asistente de programación de series por combinación de plataformas

Opción	Combinación de plataformas validada		
	Ion Chef e Ion S5	OT2 e Ion S5	OT2 e Ion PGM
Kits	Kit de secuenciación ▪ Kits Ion 510, Ion 520 e Ion 530: Chef	Kit de secuenciación ▪ Kits Ion 520 e Ion 530: OT2	Kit de secuenciación ▪ Kit de secuenciación Ion PGM Hi-Q View
	Tamaño de la plantilla: 400 pb	Tamaño de la plantilla: 400 pb	N. P.
	Flujo: 850	Flujo: 850	Flujo: 850
	Secuencia de control: deje en blanco	Secuencia de control: deje en blanco	Secuencia de control: deje en blanco
	Tipo de matriz: ▪ Matriz para Ion 520 o ▪ Matriz para Ion 530	Tipo de matriz: ▪ Matriz para Ion 520 o ▪ Matriz para Ion 530	Tipo de matriz: ▪ Matriz para Ion 316 v2 BC ▪ Matriz para Ion 318 v2 BC
	Código de barras: IonXpress o LymphoTrack_IonXpress ³	Código de barras: IonXpress o LymphoTrack_IonXpress ³	Código de barras: IonXpress o LymphoTrack_IonXpress ³
Complementos	Seleccione FileExporter ^{1,2}	Seleccione FileExporter ^{1,2}	Seleccione FileExporter ^{1,2}
Proyectos	Seleccione la carpeta pertinente del proyecto para guardar la serie o añadir un proyecto nuevo	Seleccione la carpeta pertinente del proyecto para guardar la serie o añadir un proyecto nuevo	Seleccione la carpeta pertinente del proyecto para guardar la serie o añadir un proyecto nuevo
Nombre de la placa	Introduzca el nombre de la plantilla y añada observaciones	Introduzca el nombre de la plantilla y añada observaciones	Introduzca el nombre de la plantilla y añada observaciones
Referencias	Deje todos los apartados en blanco	Deje todos los apartados en blanco	Deje todos los apartados en blanco
Control	Carga de microesferas (%) ≤ 30 Señal clave (1-100) ≤ 30 Secuencia útil (%) ≤ 30	Carga de microesferas (%) ≤ 30 Señal clave (1-100) ≤ 30 Secuencia útil (%) ≤ 30	Carga de microesferas (%) ≤ 30 Señal clave (1-100) ≤ 30 Secuencia útil (%) ≤ 30

¹Nota: Es posible que el complemento *FileExporter* de la versión 5.0.4 del software Torrent Suite™ no genere archivos FASTQ. Póngase en contacto con el servicio técnico de Thermo Fisher si recibe el mensaje DOCSTRING ERROR y necesita ayuda.

²Nota: Evite usar nombres largos, pues podrían interferir con el complemento *FileExporter*.

³Nota: Si va a utilizar la v5.2 o v5.6 del software, consulte el archivo *LymphoTrack_IonXpress.csv*, que encontrará en el CD suministrado con el software (REF 95000007).

8. Análisis de los datos

Los kits de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* (FR1/FR2/FR3) para S5/PGM se diseñaron con el objetivo de producir datos de secuenciación que pudieran analizarse con el software LymphoTrack Dx para S5/PGM, que encontrará en el CD que se incluye con el pedido (REF 95000007). **Dicho CD recoge las instrucciones de instalación y uso del software.**

Al preparar las muestras con los kits de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* (FR1/FR2/FR3) para S5/PGM, se generan archivos FASTQ que se procesan con facilidad con la aplicación de análisis de datos LymphoTrack Dx.

Caracteres en el nombre de la ruta y del archivo:

1) Evite espacios en los nombres de las rutas de los archivos de datos o del software (las rutas incluyen nombres de carpetas de archivos y de archivos); no podrá incluir más de un espacio.

2) Es fundamental que los nombres de los archivos contengan únicamente los siguientes caracteres: A-Z, a-z, 0-9, _ (guion bajo) y - (guion).

El software LymphoTrack Dx para S5/PGM puede fallar si detecta caracteres distintos de estos o más de un espacio consecutivo en el nombre del archivo. Asegúrese de usar únicamente estos caracteres al configurar la serie programada.

9. Especificaciones del ensayo

Los valores que genera el software se redondean a la cifra decimal más cercana para determinar los resultados del ensayo.

- Validez de las series en el S5 y PGM
 - Carga > 50 %
 - Enriquecimiento > 50 %
 - Clonalidad > 50 %
- % de lecturas con control positivo en *IGH* $\geq 2,5$ %
- % de lecturas con control negativo en SNG < 1,0 %
- % de lecturas con control positivo en *IGH* (REF 40880008; puede adquirirse por separado) $\geq 2,5$ %

10. Limitaciones de procedimiento

- Este kit de ensayo no identifica el 100 % de las poblaciones de células clonales.
- Los kits de ensayo basados en la PCR están sujetos a interferencia por degradación del ADN o inhibición de la amplificación mediante PCR en caso de presencia de heparina u otros fármacos en la muestra analizada.
- La mayor parte de las tecnologías, incluso las de secuenciación de nueva generación, presentan un mayor nivel de varianza cuando se alcanza el límite de detección (LD) del propio método. Deben realizarse análisis de seguimiento cuando el resultado se acerca al LD del método.
- Interprete los resultados de las pruebas de clonalidad molecular en el contexto de los datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos disponibles.

11. Interpretación y elaboración de informes

El Resumen de lecturas combinadas sirve para identificar las mejores secuencias de lecturas combinadas y su frecuencia antes de la determinación de la clonalidad a través de los criterios que se recogen a continuación. Consulte el apartado 8 *Análisis de los datos* para saber más sobre el *Resumen de lecturas combinadas*. Ciertos procesos clonales pueden dar lugar a la detección de dos o más clones. Son ejemplos de ello las poblaciones dominantes con poblaciones subclonales o el desarrollo de numerosos trastornos linfoproliferativos. Es fundamental que estos casos se interpreten en un contexto clínico.

Evalúe los datos de las tres regiones marco para determinar signos de clonalidad en la muestra. Para indicar signos de clonalidad en una muestra, basta con detectar signos de clonalidad en uno de los marcos (FR1, FR2 o FR3), incluso si los resultados del otro marco son negativos o no son válidos.

Tabla 14. Criterios de interpretación

Criterio 1	Criterio 2	Criterio 3	Resultado
El número total de lecturas de cada muestra es $\geq 20\ 000$.	La secuencia combinada superior abarca $\geq 2,5\%$ del total de lecturas.	El % de lecturas de una posible secuencia clonal combinada es > 2 veces el % de lecturas de la tercera secuencia combinada más frecuente. ¹	DETECCIÓN DE SIGNOS DE CLONALIDAD
		El % de lecturas de una posible secuencia clonal combinada es ≤ 2 veces el % de lecturas de la tercera secuencia combinada más frecuente. ¹	No se han detectado signos de clonalidad
	La secuencia combinada superior abarca $< 2,5\%$ del total de lecturas.	N. P.	No se han detectado signos de clonalidad
El número total de lecturas de cada muestra es $\geq 10\ 000$ y $< 20\ 000$.	La secuencia combinada superior abarca $\geq 5,0\%$ del total de lecturas.	El % de lecturas de una posible secuencia clonal combinada es > 2 veces el % de lecturas de la tercera secuencia combinada más frecuente. ¹	DETECCIÓN DE SIGNOS DE CLONALIDAD
		El % de lecturas de una posible secuencia clonal combinada es ≤ 2 veces el % de lecturas de la tercera secuencia combinada más frecuente. ¹	No se han detectado signos de clonalidad
	La secuencia combinada superior abarca $< 5,0\%$ del total de lecturas.	N. P.	No se han detectado signos de clonalidad
El número total de lecturas de cada muestra es $< 10\ 000$.	N. P.	N. P.	No evaluable

¹Los valores que genera el software se redondean a la cifra decimal más cercana para su comparación.

Criterios sugeridos para la interpretación de la HS

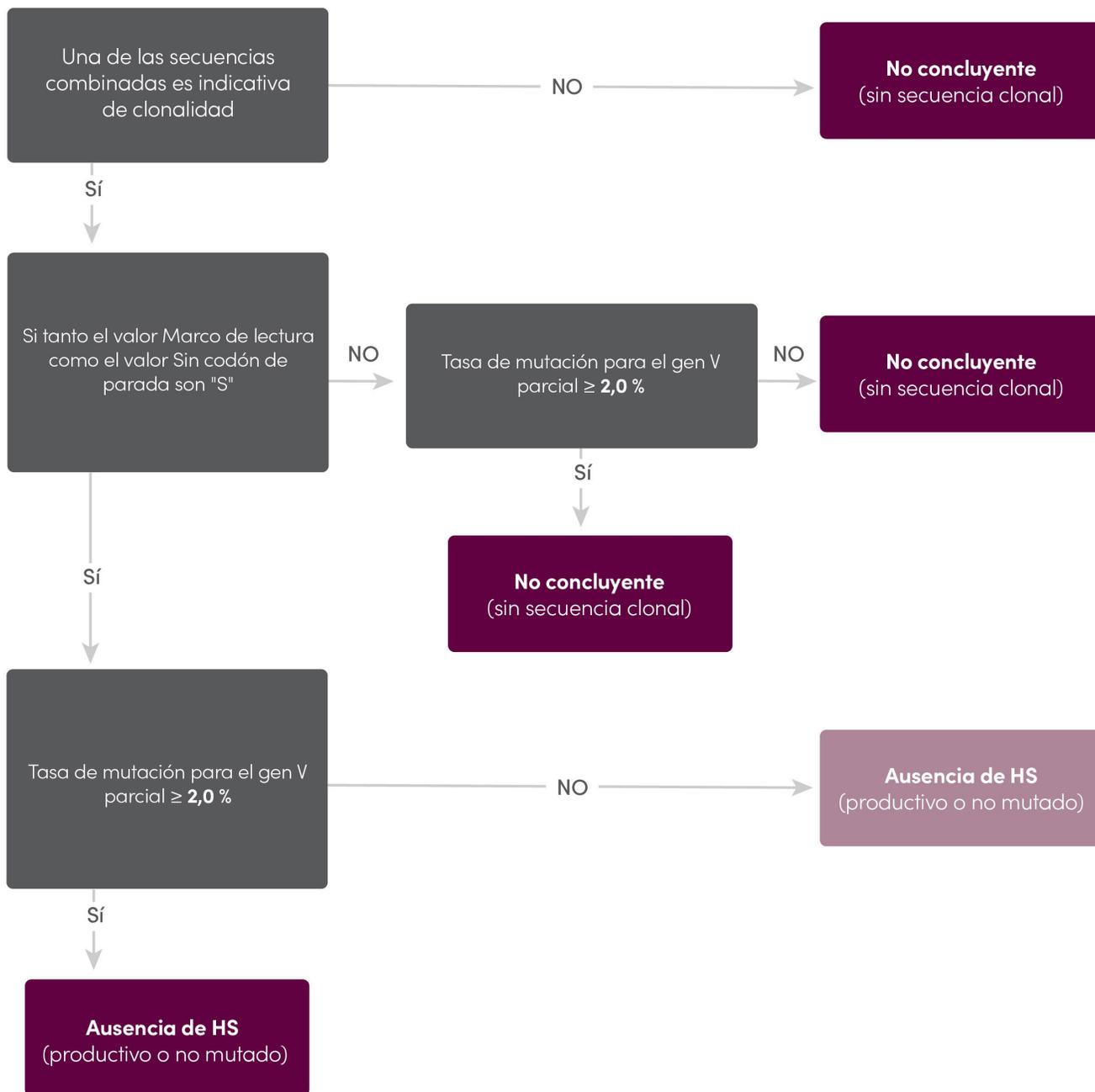


Figura 6: Interpretación de datos de acuerdo con los criterios de la Tabla 14.

Después de determinar la clonalidad, puede evaluarse la hipermutación somática (HS) de las muestras a través del kit de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* FR1 para S5/PGM. Los criterios para la interpretación de la HS que se recogen a continuación deben usarse en caso de haber realizado el análisis de la secuencia del gen de la inmunoglobulina para el pronóstico de la LLC de acuerdo con los datos actuales (Langerak *et al.*, 2011).

A fines de interpretación de la HS, evalúe las dos secuencias combinadas más relevantes y compruebe la existencia de clonalidad a partir de los criterios que figuran en el apartado anterior. Las secuencias combinadas indicativas de clonalidad pueden evaluarse a través de los criterios para la HS que figuran a continuación (consulte la Figura 7 para conocer el diagrama de flujo correspondiente). Por lo que respecta al pronóstico, interprete los reordenamientos con estados mutacionales del 2 % o una cifra cercana a esta con cautela. Los cebadores directos de *IGH* FR1 no se encuentran en el extremo 5' de la zona de *IGHV*. El cálculo de la tasa de mutación no abarca las mutaciones de los nucleótidos secuencia arriba del punto de fijación del cebador.

Tabla 15. Criterios sugeridos para la interpretación de la HS

Criterio 1	Criterio 2	Criterio 4	Resultado
Una de las secuencias combinadas es indicativa de clonalidad.	Si tanto el valor Marco de lectura como el valor Sin codón de parada son "S"	Tasa de mutación para el gen V parcial $\geq 2,0$ %	PRESENCIA DE HS (productivo o mutado)
		Tasa de mutación para el gen V parcial $< 2,0$ %	Sin presencia de HS (productivo o sin mutar)
	Si tanto el Marco de lectura como el valor Sin codón de parada son "N"	Tasa de mutación para el gen V parcial $\geq 2,0$ %	No concluyente (improductivo o mutado)
		Tasa de mutación para el gen V parcial $< 2,0$ %	No concluyente (improductivo o sin mutar)
No hay secuencias combinadas indicativas de clonalidad.	N. P.	N. P.	No concluyente (no hay secuencia clonal)

Si dos de las secuencias combinadas de una misma muestra son indicativas de clonalidad, deben volver a evaluarse de acuerdo con la Tabla 16 para determinar el resultado final de HS.

Tabla 16. Criterios sugeridos para la interpretación de la HS de reordenamiento doble

Criterio 1	Secuencia clonal A	Secuencia clonal B	Resultado
Reordenamientos dobles	PRESENCIA DE HS (productivo o mutado)	PRESENCIA DE HS (productivo o mutado)	PRESENCIA DE HS
	PRESENCIA DE HS (productivo o mutado)	Sin presencia de HS (productivo o sin mutar)	No concluyente
	PRESENCIA DE HS (productivo o mutado)	No concluyente (improductivo o mutado)	PRESENCIA DE HS
	PRESENCIA DE HS (productivo o mutado)	No concluyente (improductivo o sin mutar)	PRESENCIA DE HS
	Sin presencia de HS (productivo o sin mutar)	Sin presencia de HS (productivo o sin mutar)	Sin presencia de HS
	Sin presencia de HS (productivo o sin mutar)	No concluyente (improductivo o mutado)	No concluyente
	Sin presencia de HS (productivo o sin mutar)	No concluyente (improductivo o sin mutar)	Sin presencia de HS
	Alguna no concluyente	Alguna no concluyente	No concluyente



¹Los valores que genera el software se redondean a la cifra decimal más cercana para su comparación.

Nota: si dos de las secuencias combinadas de una misma muestra son indicativas de clonalidad, deben volver a evaluarse de acuerdo con la Tabla 16 para determinar el resultado final de HS.

Figura 7: Criterios sugeridos para la interpretación de la hipermutación somática (HS) de acuerdo con la Tabla 15.

12. Datos de la muestra

LymphoTrack Dx Report for assay IGH_FR1

Sample name: index001_001

Total Read Count: 271857

Caution: Do not edit fields and save.

Top 10 Merged Read Summary

Rank	Sequence	Length	Merge count	V-gene	J-gene	% total reads	Cumulative %	Mutation rate to partial V-gene (%)	In-frame (Y/N)	No Stop codon (Y/N)	V-coverage	CDR3 Seq
1	CATCTGGATACAC	295	28770	IGHV1-46_03	IGHJ4_02	10.58	10.58	0.00	Y	Y	100.00	GCTAGAGATCTCA
2	GCCTCTGGATTCA	116	146	IGHV3-66_03	IGHJ4_02	0.05	10.64	0.45	N	N	14.73	not found
3	TATTGTCTCTGGT	279	130	IGHV4-31_03	none	0.05	10.68	19.66	n/a	N	97.86	GCGAGACATGGTA
4	GCCTCTGGATTCA	292	102	IGHV3-23_04	IGHJ6_02	0.04	10.72	2.64	N	N	99.12	not found
5	CGCTGTCTATGGT	188	101	IGHV4-34_12	IGHJ6_02	0.04	10.76	1.33	n/a	N	34.07	not found
6	TTTCTGGATGTAC	170	96	IGHV5-51_05	IGHJ5_02	0.04	10.79	0.48	n/a	N	20.57	not found
7	CACCTTCTCTGGG	177	86	IGHV2-5_10	none	0.03	10.83	4.05	n/a	N	70.04	not found
8	TGTCATCTCCGGG	279	78	IGHV6-1_02	IGHJ6_02	0.03	10.85	11.20	Y	Y	98.34	not found
9	CTTCTGGATACAC	307	75	IGHV1-8_01	IGHJ6_02	0.03	10.88	0.00	Y	N	99.56	not found
10	CTTCTGGTTACAC	280	74	IGHV1-18_01	IGHJ4_02	0.03	10.91	0.00	Y	Y	99.56	GCGAGAGTGGATA

Figura 8: Esta tabla, que se genera por medio del LymphoTrack Dx Reporter, presenta las 10 lecturas más importantes de un total de 500 lecturas. Las lecturas se combinan entre sí cuando se diferencian en 1 o 2 pb. Las secuencias se generaron con el kit de ensayo LymphoTrack Dx IGH FR1 para S5/PGM y se analizaron con el software LymphoTrack Dx para S5/PGM (REF 95000007).

13. Rendimiento

Los resultados del kit de ensayo LymphoTrack Dx IGH FR1 para S5/PGM concuerdan con el diagnóstico del laboratorio. El porcentaje total de coincidencias, el porcentaje de coincidencias positivas (PPA) y el porcentaje de coincidencias negativas (NPA) fueron del 93 % (27/29 casos), el 88 % y el 100 %, respectivamente.

Tabla 17. Comparación entre el kit de ensayo LymphoTrack Dx IGH FR1 para S5/PGM y el diagnóstico clínico

		Diagnóstico clínico	
		Clonal	No clonal
Kit de ensayo LymphoTrack Dx IGH FR1 para S5/PGM	Clonal	15	2
	No clonal	0	12

El rendimiento analítico del kit de ensayo LymphoTrack Dx IGH FR1 para S5/PGM se evaluó mediante el análisis de ADN de una estirpe celular clonal y ADN de amígdalas en distintas diluciones. El límite de detección (LD) se observó en una dilución de ADN al 5 %. El mayor porcentaje de lecturas de ADN de amígdala fue < 1,0 %. La regresión lineal R² fue > 0,99 para un intervalo de entre el 0 % y el 10 % de dilución de ADN. El coeficiente de variación (CV%) en 8 series (por instrumento, Ion S5 e Ion PGM) de 2 operadores, 2 lotes de reactivos y 2 instrumentos fue inferior al 10 % cuando se analizaron diluciones del 5 % y 10 % de ADN.

Figura 9: Comparación de la tasa de hipermutación somática (HS) de 27 muestras determinadas a través del kit de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* FR1 para S5/PGM y analizadas con el software LymphoTrack Dx para S5/PGM o el programa IMGT

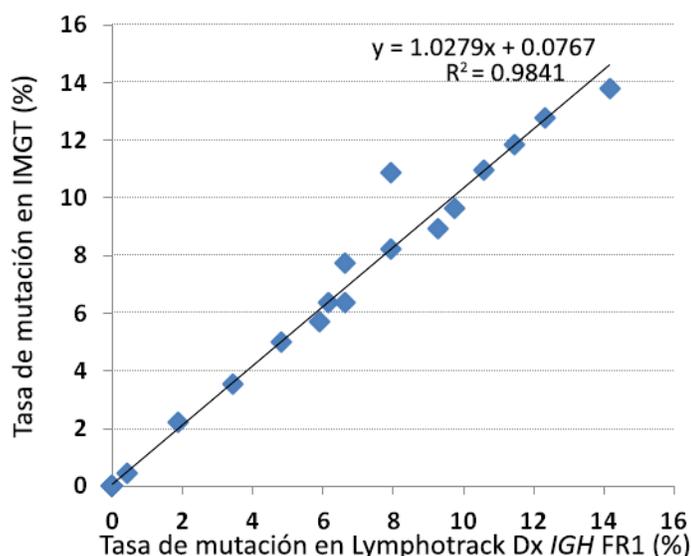


Tabla 18. Comparación del método de análisis de la hipermutación somática (HS): software LymphoTrack Dx para S5/PGM frente al método de control (IMGT).

		IMGT	
		Mutado	Sin mutar
Software LymphoTrack Dx para S5/PGM	Mutado	14	0
	Sin mutar	1	12

El uso del kit de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* FR1/2/3 para S5/PGM implicó una mayor identificación de secuencias clonales que el uso del kit de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* FR1 para S5/PGM. Se compararon los resultados del ensayo LymphoTrack Dx *IGH* FR1/2/3 para S5/PGM con los resultados derivados de los ensayos tradicionales de electroforesis capilar (ensayo de clonalidad génica IdentiClone® *IGH* (tubos A+B+C) y detección en ABI [REF 91010061]). El porcentaje total de coincidencias, el porcentaje de coincidencias positivas (PPA) y el porcentaje de coincidencias negativas (NPA) fueron del 98 % (40/41 casos), el 100 % y el 95 %, respectivamente.

Tabla 19. Comparación entre el ensayo LymphoTrack Dx *IGH* FR1/2/3 para S5/PGM y el ensayo de clonalidad génica IdentiClone *IGH* para ABI

		Kit de ensayo de clonalidad génica IdentiClone <i>IGH</i> para ABI	
		Clonal	No clonal
Kit de ensayo LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR1/2/3 para S5/PGM	Clonal	22	0
	No clonal	1	18

14. Guía de resolución de problemas

Tabla 20. Resolución de problemas

Se produce durante	Error	Acción
Preparación de muestras y reactivos	La cantidad de ADN de la muestra es inferior a 50 ng de acuerdo con un método basado en ADNbc	No analice la muestra
Preparación de muestras y reactivos	La integridad del ADN de la muestra es baja	Analice la muestra con la Specimen Control Size Ladder de Invivoscribe (REF 20960021, para la detección en ABI, o REF 20960020, para la detección en gel)
Creación de la genoteca mediante cuantificación y agrupamiento de amplicones	La concentración de amplicones es inferior a 1 nm	Revise la escalera del bioanalizador o el LabChip GX y repita la PCR si el resultado es inferior a 1 nm.
Preparación de la plantilla y arranque del S5 o PGM	N. P.	Llame al soporte técnico de Thermo Fisher Scientific al +1-800-831-6844
Instalación del CD	El software LymphoTrack Dx no se instala satisfactoriamente	Llame al soporte técnico de Invivoscribe al +1-858-224-6600
Análisis de datos	El software LymphoTrack Dx deja de funcionar	Llame al soporte técnico de Invivoscribe al +1-858-224-6600
Análisis de datos	No se ejecutan las macros en Excel	Llame al soporte técnico de Invivoscribe al +1-858-224-6600
Análisis de datos	No se detecta la secuencia clonal del control positivo	Llame al soporte técnico de Invivoscribe al +1-858-224-6600
Control en blanco (CB)	El CB indica amplificación tras la PCR	Repita el ensayo

15. Servicio técnico y atención al cliente

Gracias por adquirir los kits de ensayo LymphoTrack Dx *IGH* (FR1/FR2/FR3) para S5/PGM. Damos a su negocio el valor que realmente tiene. Será un placer ayudarlo a comprender cómo funciona el kit de ensayo. Proporcionamos asistencia técnica continuada de lunes a viernes, de modo que pueda seguir usando los kits de ensayo en su laboratorio.

Datos de Contacto



Invivoscribe, Inc

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

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

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

16. Referencias

- Tonegawa, S. (1983): Somatic Generation of Antibody Diversity. Nature 302:575-581.
- Ghia, P. *et al.*, (2007): ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 21, 1–3.
- Trainor, K. J. *et al.* (1990): Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. Blood 75:2220-2222.
- Miller, J.E. (2013): Principle of Immunoglobulin and T Cell Receptor Gene Rearrangement. En Cheng, L.; Zhang, D.; Eble, J. N. (eds.). *Molecular Genetic Pathology* (2nd Ed., sections 30.2.7.13 and 30.2.7.18). New York, USA: Springer Science & Business Media.
- Instrucciones de uso del software LymphoTrack Dx para S5/PGM (REF 95000007)
- Manual del usuario: Ion 510 & Ion 520 & Ion 530 Kit-Chef (REF Man0016854, Rev. C.0)
- Manual del usuario del Ion 520 & Ion 530 Kit OT2 (REF Man0010844, Rev. D.0)
- Manual del usuario del Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit (REF Man0014579, Rev A.0)
- Manual del usuario del Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit (REF Man0014583, Rev A.0)
- Guía del DNA 1000 Kit de Agilent
- Manual del usuario del LabChip GX/GX II
- Manual del usuario del HT DNA High Sensitivity LabChip Kit LabChip GX/GXII
- <http://www.thermofisher.com>
- <http://ioncommunity.thermofisher.com>
- <http://www.agilent.com>
- <http://www.perkinelmer.com>

17. Símbolos

Los siguientes símbolos se usan en el etiquetado de los productos de diagnósticos por SNG de Invivoscribe.

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

18. Aviso legal

Este producto está cubierto por una o más de las siguientes patentes o solicitudes de patente propiedad de, o con licencia exclusiva para, Invivoscribe, Inc. (IVS): patente de los Estados Unidos núm.: 7.785.783; patente de los Estados Unidos núm.: 8.859.748 (junto con las solicitudes de división relacionadas con la solicitud original); patente europea núm.: EP 1549764B1 (validada en 16 países y ampliada por las patentes europeas núm. EP2418287A3 y EP 2460889A3); patente japonesa núm.: JP04708029B2; solicitud de patente japonesa núm.: 2006-529437; solicitud de patente brasileña núm.: PI0410283.5; patente canadiense núm.: CA2525122; patente india núm.: IN243620; patente mexicana núm.: MX286493; patente china núm.: CN1806051; y patente coreana núm.: 101215194.

El uso de este producto puede requerir métodos de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La adquisición de las licencias necesarias para usar métodos de amplificación, reactivos, enzimas de amplificación o equipos cubiertos por patentes de terceros es responsabilidad del usuario. Invivoscribe, Inc. no otorga dicha licencia de forma explícita ni implícita.

©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 dueños.

19. Kits de ensayo LymphoTrack Dx IGH (FR1/FR2/FR3) para Ion S5: guía sintética

- 19.1. Póngase los guantes para sacar las mezclas maestras del congelador. Utilice una mezcla maestra indexada distinta por cada muestra y control. Deje que los tubos de la muestra maestra se descongelen. A continuación, mezcle con el agitador vorticial.
- 19.2. Encienda la campana de extracción o la cabina para PCR y pipetee 45 µl de la mezcla maestra en los pocillos de una placa de PCR para muestras y controles positivos, negativos y en blanco (un pocillo por cada mezcla maestra indexada).
- 19.3. Añada 0,2 µl de ADN polimerasa Taq o equivalente (a 5 U/µl) a cada mezcla maestra.
- 19.4. Añada 5 µl de la muestra de ADN (en una concentración mínima de 10 ng/µl) y 5 µl de las muestras de control a los pocillos que contengan las reacciones de la mezcla maestra y pipetee arriba y abajo 5-10 veces para mezclar.
- 19.5. Añada 5 µl de agua para uso en biología molecular al pocillo que contenga la mezcla maestra para el control en blanco y pipetee arriba y abajo 5-10 veces para mezclar.
- 19.6. Cierre la placa y amplifique el ADN diana usando el programa estándar del termociclador.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclo
1	95°C	7 minutos	1
2	95°C	45 segundos	29x
3	60°C	45 segundos	
4	72°C	90 segundos	
5	72°C	10 minutos	1
6	15 °C	∞	1

- 19.7. Extraiga la placa de amplificación del termociclador.
- 19.8. Purifique los productos derivados de la PCR por medio del sistema de purificación para PCR AMPure XP de Agencourt. Añada 90 µl de partículas por cada 50 µl y, a continuación, eluya el ADN purificado en 40 µl de una solución amortiguadora TE.
- 19.9. Cuantifique los amplicones siguiendo el método pertinente (*p. ej.*, el bioanalizador Agilent 2100 o el LabChip GX).
- 19.10. En función de la cuantificación, vierta una cantidad igual de cada amplicón en un tubo (no vierta el control en blanco); utilice la solución amortiguadora TE para alcanzar un volumen de 10 µl para cada mezcla maestra. Mezcle suavemente en el agitador vorticial y centrifugue.
- 19.11. Diluya la genoteca a 20 pm con agua exenta de nucleasas.
- 19.12. Proceda con la PCR en emulsión a fin de preparar la plantilla. Para ello, use el Ion Chef o el Ion OT2 acoplados al Ion ES:
 - a. Use el equipo Ion Chef y los kits Ion 510, Ion 520 e Ion 530: Chef, o
 - b. Use el equipo Ion OneTouch y los kits Ion 520 e Ion 530: OT2.
- 19.13. Encienda el Ion S5 y cargue la matriz para el Ion 520 o el Ion 530 con las ISP.
- 19.14. Configure una serie programada con el navegador Torrent.
- 19.15. Inicie la serie del Ion S5.
- 19.16. Analice y visualice los datos adquiridos por medio del paquete de software LymphoTrack para S5/PGM.

20. Kits de ensayo LymphoTrack Dx IGH (FR1/FR2/FR3) para Ion PGM: guía sintética

- 20.1. Póngase los guantes para sacar las mezclas maestras del congelador. Utilice una mezcla maestra indexada distinta por cada muestra y control. Deje que los tubos de la muestra maestra se descongelen. A continuación, mezcle con el agitador vorticial.
- 20.2. Encienda la campana de extracción o la cabina para PCR y pipetee 45 µl de la mezcla maestra en los pocillos de una placa de PCR para muestras y controles positivos, negativos y en blanco (un pocillo por cada mezcla maestra indexada).
- 20.3. Añada 0,2 µl de ADN polimerasa Taq (5 U/µl) a cada mezcla maestra.
- 20.4. Añada 5 µl de la muestra de ADN (en una concentración mínima de 10 ng/µl) y 5 µl de las muestras de control a los pocillos que contengan las reacciones de la mezcla maestra y pipetee arriba y abajo 5-10 veces para mezclar.
- 20.5. Añada 5 µl de agua para uso en biología molecular al pocillo que contenga la mezcla maestra para el control en blanco y pipetee arriba y abajo 5-10 veces para mezclar.
- 20.6. Cierre la placa y amplifique el ADN diana usando el programa estándar del termociclador.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclo
1	95°C	7 minutos	1
2	95°C	45 segundos	29x
3	60°C	45 segundos	
4	72°C	90 segundos	
5	72°C	10 minutos	1
6	15 °C	∞	1

- 20.7. Extraiga la placa de amplificación del termociclador.
- 20.8. Purifique los productos derivados de la PCR por medio del sistema de purificación para PCR AMPure XP de Agencourt. Añada 90 µl de partículas por cada 50 µl y, a continuación, eluya el ADN purificado en 40 µl de una solución amortiguadora TE.
- 20.9. Cuantifique los amplicones siguiendo el método pertinente (*p. ej.*, el bioanalizador Agilent 2100 o el LabChip GX).
- 20.10. En función de la cuantificación, vierta una cantidad igual de cada amplicón en un tubo (no vierta el control en blanco); utilice la solución amortiguadora TE para alcanzar un volumen de 10 µl para cada mezcla maestra. Mezcle suavemente en el agitador vorticial y centrifugue.
- 20.11. Diluya la genoteca a 20 pm con la solución amortiguadora 1X TE o el agua exenta de nucleasas que se suministra con el kit Hi-Q View OT2.
- 20.12. Utilice el instrumento Ion OneTouch 2 y el kit Ion PGM Hi-Q View OT2 para ejecutar la PCR por emulsión y generar partículas Ion Sphere (ISP) positivas.
- 20.13. Enriquezca las ISP positivas usando el Ion OneTouch ES.
- 20.14. Encienda el Ion PGM y cargue la matriz para el Ion 316 o el Ion 318 v2 BC con las ISP.
- 20.15. Configure una serie programada con el navegador Torrent.
- 20.16. Inicie la serie del Ion PGM.
- 20.17. Analice y visualice los datos adquiridos por medio del paquete de software LymphoTrack Dx para S5/PGM.

21. Anexo A: Configurar el complemento *FileExporter* y cargar los códigos de barras personalizados

Si va a usar la v5.2.2 o v5.6 del software Torrent Suite, verifique la configuración del complemento *FileExporter* y cargue los códigos de barras personalizados usando el archivo *LymphoTrack_IonXpress.csv* que se incluye en el CD suministrado (REF 95000007).

21.1. Compruebe la configuración del complemento *FileExporter*.

- 21.1.1. Inicie sesión como administrador en el software Torrent Suite.
- 21.1.2. Compruebe que la configuración del complemento *FileExporter* sea la correcta.
 - Pulse el icono con forma de engranaje () de la *Torrent Suite Server Home Screen* (pantalla de inicio del servidor del *Torrent Suite*) y seleccione **Plugins (Complementos)** en el menú desplegable.
 - Busque el complemento *FileExporter* y haga clic en el icono con forma de engranaje. A continuación, seleccione **Configure (Configurar)** para abrir la ventana de configuración.
 - En **File > Options (Archivo > Opciones)**, marque todas las casillas sobre FASTQ.
 - En *Archive Type (Tipo de archivo)*, seleccione **Zip (Zip)**.
 - Seleccione la Naming Option (opción de denominación) que corresponda.
 - Guarde la configuración.
- 21.1.3. Compruebe los Change Plugin Configuration (cambios de configuración del complemento) por lo que respecta a *FileExporter*.
 - Haga clic en el icono con forma de engranaje () y seleccione **Configure (Configurar)**.
 - Desplácese hacia abajo y haga clic en **Admin Interface (Interfaz de administración)**.
 - Desplácese hacia abajo y seleccione **Plugins (Complementos)** en el lateral izquierdo. A continuación, seleccione **FileExporter**.
 - Asegúrese de que junto a *Status* y *Userinputfields* aparezca { }. De lo contrario, elimine el contenido hasta que aparezca { }. No cambie ningún otro parámetro (a menos que se indique aquí).
 - Seleccione **Save (Guardar)**.

21.2. Cargue los códigos de barras personalizados.

- 21.2.1. Inicie sesión como administrador en el software Torrent Suite.
 - Seleccione el icono con forma de engranaje () y, a continuación, seleccione **References (Referencias)** en el menú desplegable.
 - Seleccione **Barcodes (Códigos de barras)** y, a continuación, seleccione **Add new DNA Barcodes (Añadir códigos de barras de ADN nuevos)**.
 - Seleccione **Choose File (Seleccionar archivo)** y cargue el archivo *LymphoTrack_IonXpress.csv*.
 - Dé un nombre al *Barcode Set Name (conjunto de códigos de barras)* (p.ej., *LymphoTrack_IonXpress*) y haga clic en **Upload (Cargar)**.
 - El nombre del conjunto de códigos de barras se utilizará en todos los ensayos *LymphoTrack* de las muestras programadas.
 - Asegúrese de que los códigos de barras que haya añadido aparezcan en el menú **Barcodes (Códigos de barras)**.
- 21.2.2. Vaya al apartado 7.12. *Configurar una serie programada*.