

Istruzioni per l'uso



LymphoTrack® Dx IGH (FR1/FR2/FR3) Assay – S5/PGM™

Per l'identificazione e la tracciatura dei riarrangiamenti clonali dei geni codificanti per la catena pesante *IGH* delle immunoglobuline linfociti B utilizzando il sequenziamento di nuova generazione con il sistema Thermo Fisher Scientific® Ion S5™ e Ion PGM™.

IVD Questo saggio è per uso diagnostico *in vitro*.

Rappresentazione schematica del locus genico *IGH* e delle regioni framework (FR) bersaglio:



Condizioni di conservazione: da **-85°C** a **-65°C**

(I controlli di DNA possono essere separati dai kit del saggio e conservati a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C)

N. di catalogo	Prodotti	Quantità
REF 91210007	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR1 Assay – S5/PGM	12 indici – 5 reazioni ciascuno
REF 91210037	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR2 Assay – S5/PGM	12 indici – 5 reazioni ciascuno
REF 91210047	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR3 Assay – S5/PGM	12 indici – 5 reazioni ciascuno
REF 91210057	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR1/2/3 Assay – S5/PGM	12 indici per bersaglio – 5 reazioni ciascuno

Indice

1.	USO PREVISTO	3
2.	SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST	3
2.1	Contesto	3
2.2	Sommario	4
3.	PRINCIPI DELLA PROCEDURA.....	5
3.1	Reazione a catena della polimerasi (PCR).....	5
3.2	Purificazione degli ampliconi.....	5
3.3	Quantificazione degli ampliconi	5
3.4	Sequenziamento di nuova generazione (NGS)	5
3.5	Multiplexing degli ampliconi	6
3.6	Valutazione dell'ipermutazione somatica (SHM) di <i>IGHV</i>	6
4.	REAGENTI.....	7
4.1	Componenti del reagente.....	7
4.2	Avvertenze e precauzioni	10
4.3	Conservazione e manipolazione	10
5.	STRUMENTI	11
6.	RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	12
6.1	Precauzioni	12
6.2	Sostanze interferenti	12
6.3	Requisiti e manipolazione dei campioni	12
6.4	Conservazione dei campioni.....	12
7.	PROCEDURA DEL SAGGIO	13
7.1	Materiali forniti	13
7.2	Materiali necessari (non forniti)	13
7.3	Preparazione dei reagenti	14
7.4	Amplificazione	14
7.5	Purificazione con AMPure XP	15
7.6	Quantificazione degli ampliconi	16
7.7	Pooling e quantificazione della libreria	19
7.8	Diluizione della libreria sottoposta a pooling.....	19
7.9	Preparazione del template e sequenziamento con Ion Chef e Ion S5.....	19
7.10	Preparazione del template e sequenziamento con Ion OT2 e Ion S5.....	19
7.11	Preparazione del template e sequenziamento con Ion OT2 e Ion PGM.....	20
7.12	Creare una corsa pianificata.....	21
8.	ANALISI DEI DATI.....	22
9.	SPECIFICHE DEL SAGGIO.....	23
10.	LIMITI DELLA PROCEDURA	23
11.	INTERPRETAZIONE E REFERTAIONE	23
12.	DATI DEL CAMPIONE	28
13.	CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI.....	28
14.	GUIDA ALLA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	30
15.	ASSISTENZA TECNICA E ASSISTENZA CLIENTI.....	30
16.	BIBLIOGRAFIA.....	31
17.	SIMBOLI.....	31
18.	AVVISO LEGALE.....	32
19.	LYMPHOTrack Dx <i>IGH</i> (FR1/FR2/FR3) Assay – S5: GUIDA DI UNA SOLA PAGINA.....	33
20.	LYMPHOTrack Dx <i>IGH</i> (FR1/FR2/FR3) Assay – PGM: GUIDA DI UNA SOLA PAGINA.....	34
21.	APPENDICE A: CONFIGURARE IL PLUGIN DI <i>FILEEXPORTER</i> E CARICARE I CODICI A BARRE PERSONALIZZATI	35
21.1	Verificare la configurazione del plugin di <i>FileExporter</i>	35
21.2	Load Custom Barcodes (Carica codici a barre personalizzati).	35

1. Uso previsto

Uso previsto (LymphoTrack Dx *IGH* FR1 Assay – S5/PGM)

Il LymphoTrack Dx *IGH* FR1 Assay – S5/PGM è un prodotto per diagnostica *in vitro* destinato alla determinazione, basata sul sequenziamento di nuova generazione (NGS), della distribuzione di frequenza dei riarrangiamenti dei geni *IGH* e del grado di ipermutazione somatica (SHM) dei geni riarrangiati in pazienti con sospetta patologia linfoproliferativa. Questo saggio è utile per l'identificazione dei disturbi linfoproliferativi e contribuisce alla determinazione della prognosi attraverso l'utilizzo della piattaforma Thermo Fisher Scientific Ion S5 o Ion PGM.

Uso previsto (LymphoTrack Dx *IGH* FR1/2/3 Assay – S5/PGM)

Il LymphoTrack Dx *IGH* FR1 Assay – S5/PGM è un prodotto per diagnostica *in vitro* destinato al sequenziamento di nuova generazione (NGS), che ha come bersaglio la regione framework 1 (FR1) conservata nei segmenti V_H del gene *IGH* per la determinazione della distribuzione di frequenza dei riarrangiamenti clonali di *IGH* V_H–J_H e del grado di ipermutazione somatica (SHM) dei geni riarrangiati in pazienti con sospetta patologia linfoproliferativa. Questo saggio è utile per l'identificazione dei disturbi linfoproliferativi e contribuisce alla determinazione della prognosi attraverso l'utilizzo della piattaforma Thermo Fisher Scientific Ion S5 o Ion PGM.

Il LymphoTrack Dx *IGH* FR2 Assay – S5/PGM è un prodotto per diagnostica *in vitro* destinato al sequenziamento di nuova generazione (NGS) con gli strumenti Ion S5 e Ion PGM di Thermo Fisher Scientific. Il saggio permette di determinare la distribuzione di frequenza dei riarrangiamenti dei geni *IGH* V_H – J_H in pazienti con sospetta patologia linfoproliferativa. Questo saggio è utile per l'identificazione dei disturbi linfoproliferativi attraverso l'utilizzo della piattaforma Ion S5 o Ion PGM di Thermo Fisher Scientific.

Il LymphoTrack Dx *IGH* FR3 Assay – S5/PGM è un prodotto per diagnostica *in vitro* destinato al sequenziamento di nuova generazione (NGS) con gli strumenti Ion S5 e Ion PGM di Thermo Fisher Scientific. Il saggio permette di determinare la distribuzione di frequenza dei riarrangiamenti dei geni *IGH* V_H – J_H in pazienti con sospetta patologia linfoproliferativa. Questo saggio è utile per l'identificazione dei disturbi linfoproliferativi attraverso l'utilizzo della piattaforma Ion S5 o Ion PGM di Thermo Fisher Scientific.

2. Sommario e spiegazione del test

2.1 Contesto

Il locus dei geni che codificano per la catena pesante delle immunoglobuline (*IGH*), situato sul cromosoma 14 (14q32.3), include 46-52 segmenti genici funzionali e 30 non funzionali della regione variabile (V_H), 27 segmenti genici funzionali di diversità (D_H) e 6 segmenti genici funzionali di giunzione (J_H) distribuiti su 1.250 kilobasi. I segmenti genici V_H contengono tre regioni framework (FR) conservate e due regioni determinanti la complementarità (CDR) variabili.

Le cellule linfoidi sono diverse dalle altre cellule somatiche dell'organismo; durante lo sviluppo, i geni dei recettori antigenici delle cellule linfoidi vanno incontro a riarrangiamento genico somatico (Tonegawa S., 1983). Per esempio, durante lo sviluppo dei linfociti B i geni che codificano per le molecole *IGH* vengono assemblati a partire da molteplici segmenti genici polimorfici che vanno incontro a riarrangiamenti e selezione, generando combinazioni V_H–D_H–J_H che sono uniche sia in termini di lunghezza che di sequenza. Poiché le leucemie e i linfomi hanno origine dalla trasformazione maligna di singole cellule linfoidi, generalmente la cellule leucemiche e linfocitarie di un soggetto condividono uno o più riarrangiamenti cellula-specifici o "clonali" dei geni dei recettori antigenici. Pertanto, i test che permettono di rilevare i riarrangiamenti clonali di *IGH* possono essere utili nello studio delle neoplasie maligne che coinvolgono i linfociti B e T.

Inoltre, lo stato di ipermutazione dei geni della regione variabile della catena pesante delle immunoglobuline (*IGHV*) offre informazioni prognostiche importanti per i pazienti affetti da leucemia linfocitica cronica (LLC) e linfoma a piccoli linfociti (SLL). La presenza di ipermutazione somatica (SHM) di *IGHV* è definita come una differenza pari o superiore al 2% rispetto alla sequenza genica V_H della linea germinale, laddove una differenza inferiore al 2% è considerata evidenza di assenza di ipermutazione somatica. Lo stato di ipermutazione somatica per il/i clone/i ha rilevanza clinica per la LLC-B, poiché esiste una netta distinzione nella sopravvivenza mediana dei pazienti con o senza ipermutazione somatica. L'ipermutazione della regione *IGHV* è fortemente predittiva di una buona prognosi, mentre l'assenza di mutazione è predittiva di una prognosi sfavorevole (Ghia P. *et al.*, 2007).

Inizialmente i riarrangiamenti clonali venivano identificati utilizzando tecniche basate su frammenti di restrizione e ibridazione mediante Southern blot (RF-SBH). Tuttavia, questi test si sono rivelati complicati e impegnativi, richiedevano grandi quantità di DNA e non erano adatti all'analisi di molti dei loci dei recettori antigenici meno eterogenei.

Negli ultimi decenni, l'uso dei saggi RF-SBH è stato soppiantato dai test di clonalità basati su PCR sviluppati da Alexander Morley (Trainor K.J. *et al.*, 1990), che attualmente sono considerati il metodo di riferimento. Questi saggi permettono di determinare la clonalità sulla base della sovrarappresentazione di riarrangiamenti genici $V_H-D_H-J_H$ (o prodotti D_H-J_H incompleti) amplificati, a seguito della loro separazione mediante elettroforesi su gel o capillare. Benché siano sensibili e adatti all'analisi di piccole quantità di DNA, questi saggi non permettono di differenziare rapidamente popolazioni clonali e riarrangiamenti multipli che potrebbero nascondersi sotto un picco monodimensionale, e non sono progettati per identificare la sequenza specifica di DNA V_H-J_H che è necessaria per la tracciatura delle popolazioni clonali nelle analisi successive.

2.2 Sommario

Il LymphoTrack Dx *IGH* (FR1/FR2/FR3) Assay – Ion S5/PGM (venduto separatamente o come set) rappresenta un significativo miglioramento rispetto ai saggi di clonalità esistenti che impiegano l'analisi dei frammenti, dal momento che permettono di rilevare efficacemente i riarrangiamenti genici di *IGH* e, contemporaneamente, di identificare la sequenza di DNA specifica per ogni riarrangiamento genico clonale. Pertanto, questi saggi hanno due usi importanti e complementari: forniscono informazioni essenziali sull'esistenza di clonalità e identificano informazioni di sequenza necessarie per la tracciatura di tali cloni nei campioni successivi. Inoltre, il LymphoTrack Dx *IGH* FR1 Assay fornisce informazioni di sequenza dettagliate sul grado di SHM.

Ogni singola master mix multiplex ha come bersaglio una delle regioni framework conservate di *IGH* (FR1, FR2 o FR3) nelle regioni V_H e J_H descritte nei tumori maligni linfoidi. La possibilità di analizzare tutte e tre le regioni framework riduce significativamente il rischio di non riuscire a rilevare la presenza di clonalità, poiché le ipermutazioni somatiche nei siti di legame dei primer dei segmenti genici V_H coinvolti possono ostacolare l'amplificazione del DNA (Evans P.A. *et al.*, 2007). **Per determinare l'evidenza di clonalità per un campione sono necessari i dati relativi a tutte e tre le regioni framework.**

I primer inclusi nelle master mix sono disegnati con adattatori Thermo Fisher Scientific e fino a 12 indici diversi. Questo saggio permette di eseguire una PCR one-step e di raggruppare in pool gli ampliconi derivanti da svariati campioni e target diversi (generati con altri saggi LymphoTrack Dx per Ion S5 o Ion PGM) su un singolo chip Ion S5 o PGM, offrendo la possibilità di analizzare in parallelo fino a 12 campioni per target in un'unica corsa di sequenziamento.

Il LymphoTrack Dx Software – S5/PGM associato offre un'interpretazione diretta dei dati generati dai LymphoTrack Dx Assay attraverso un metodo di analisi e visualizzazione dei dati semplice ed efficace. Seguendo le indicazioni fornite nella sezione 11: *Interpretazione e refertazione*, i risultati dei campioni riepilogati nel software possono essere facilmente interpretati per determinare la presenza o assenza di clonalità e ipermutazione somatica. **I risultati dei test molecolari di clonalità devono sempre essere interpretati nel contesto di dati clinici, istologici e immunofenotipici.**

Nel kit sono inclusi controlli positivi e negativi per la clonalità. È disponibile un controllo positivo aggiuntivo opzionale per l'ipermutazione somatica, che può essere acquistato separatamente ([REF](#) 40880008).

Nota: Per spiegazioni più dettagliate riguardo al locus e alla strategia di sequenziamento mirata, consultare (Miller J.E., 2013).

3. Principi della procedura

3.1 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

I saggi di PCR sono abitualmente utilizzati per l'identificazione delle popolazioni di linfociti B e T clonali. Questi saggi permettono di amplificare il tratto di DNA compreso tra primer che hanno come bersaglio le regioni framework V e J conservate dei geni dei recettori antigenici. Tali primer hanno come bersaglio queste regioni conservate e si trovano su entrambi i lati di un'area in cui si verificano riarrangiamenti genetici programmati durante la maturazione di tutti i linfociti B e T. Tali riarrangiamenti genetici sono all'origine della generazione di popolazioni diverse di linfociti B e T.

I geni dei recettori antigenici che vengono sottoposti a riarrangiamenti sono i loci della catena pesante (*IGH*) e della catena leggera (*IGK* e *IGL*) delle immunoglobuline nei linfociti B e i loci dei geni del recettore dei linfociti T (*TRA*, *TRB*, *TRG* e *TRD*) nei linfociti T. Ogni linfocito B e T presenta uno o due riarrangiamenti produttivi V–J che sono unici sia in termini di lunghezza che di sequenza. Pertanto, quando il DNA di una popolazione normale o policlonale viene amplificato utilizzando primer di DNA che affiancano la regione V–J, vengono generati ampliconi unici per quanto riguarda la lunghezza e la sequenza, che riflettono l'eterogeneità della popolazione. In alcuni casi, quando il DNA linfocitario è assente, non viene generato alcun amplicone. In caso di campioni contenenti popolazioni clonali per *IGH*, il risultato è costituito da uno o due prodotti preminenti amplificati aventi la stessa sequenza e lunghezza, che vengono rilevati con una frequenza significativa, in un background policlonale ridotto.

3.2 Purificazione degli ampliconi

Gli ampliconi di PCR vengono purificati per rimuovere primer, nucleotidi, sali ed enzimi in eccesso impiegando la tecnologia di immobilizzazione reversibile in fase solida (SPRI) con biglie paramagnetiche per la purificazione ad alto rendimento di ampliconi di PCR. Utilizzando un tampone ottimizzato, gli ampliconi di PCR con dimensioni di 100 bp o maggiori si legano selettivamente alle biglie paramagnetiche mentre i contaminanti, quali dNTP non incorporati e primer, dimeri di primer e sali in eccesso vengono lavati via. Gli ampliconi possono quindi essere eluiti e separati dalle biglie paramagnetiche in modo da ottenere un prodotto di PCR più purificato per l'analisi a valle e la quantificazione degli ampliconi.

3.3 Quantificazione degli ampliconi

Gli ampliconi purificati vengono quantificati utilizzando l'elettroforesi capillare, che applica i principi della tradizionale elettroforesi su gel per separare e quantificare il DNA su una piattaforma basata su chip. La quantificazione si ottiene analizzando un marker di concentrazione nota insieme agli ampliconi di PCR e quindi estrapolando la concentrazione degli ampliconi. Il calcolo della concentrazione degli ampliconi di PCR permette di fare in modo che gli ampliconi risultino ugualmente rappresentati nella libreria finale sottoposta a pooling (raggruppamento) che viene caricata sulla cartuccia Ion S5 o sul chip Ion PGM per il sequenziamento.

3.4 Sequenziamento di nuova generazione (NGS)

I metodi di sequenziamento di Sanger sono quelli più diffusi nella gamma di tecnologie di sequenziamento degli acidi nucleici di "prima generazione". Metodi più recenti, che sfruttano approcci di sequenziamento massivo in parallelo, sono spesso definiti come NGS. Queste tecnologie possono utilizzare varie strategie combinate di preparazione del template, sequenziamento, imaging e bioinformatica per l'allineamento e l'assemblaggio del genoma.

Le tecnologie NGS utilizzate in questo saggio si basano sull'amplificazione di sequenze genetiche mediante una serie di primer consenso diretti e inversi che includono tag costituiti da adattatori e indici. Gli ampliconi generati con le master mix LymphoTrack Dx vengono quantificati, raggruppati in pool e caricati su un chip per il sequenziamento con la piattaforma Ion S5 o Ion PGM di Thermo Fisher Scientific. Queste piattaforme richiedono che la libreria raggruppata in pool di frammenti di DNA venga legata a singole biglie prima del sequenziamento, con una sequenza unica per biglia. Una volta legati alle biglie, i frammenti di DNA vengono amplificati tramite PCR in emulsione finché ricoprono la superficie della biglia. Le biglie vengono quindi caricate su un chip semiconduttore, in cui ciascuna biglia occupa un singolo pozzetto e si verifica il sequenziamento.

Il sequenziamento viene eseguito inondando il chip con singoli nucleotidi non incorporati una base alla volta (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), e gli strumenti di sequenziamento rilevano l'aggiunta di nucleotidi quando gli ioni idrogeno vengono rilasciati durante la polimerizzazione del DNA causando una variazione di pH nei pozzetti, misurata come

variazione di tensione. La tensione varia proporzionalmente al numero dei nucleotidi aggiunti. Dopo che i nucleotidi sono stati incorporati, quelli non incorporati vengono eliminati e il processo ricomincia con un nuovo dNTP.

3.5 Multiplexing degli ampliconi

Questi prodotti sono stati progettati per consentire due diversi livelli di multiplexing, al fine di ridurre i costi e i tempi di laboratorio. Il primo livello di multiplexing deriva dagli indici multipli, fino a un massimo di 12, che vengono forniti con i saggi. Ognuno di questi 12 indici agisce come un codice a barre univoco che consente di raggruppare in pool gli ampliconi di singoli campioni dopo l'amplificazione PCR per generare la libreria di sequenziamento. Le sequenze ottenute sono ordinate dal software bioinformatico per identificare quelle originate da un singolo campione.

Il secondo livello di multiplexing deriva dalla capacità del software associato di ordinare i dati di sequenziamento sia per indice sia per target. Ciò consente di raggruppare in pool gli ampliconi ottenuti con primer mirati (anche quelli contrassegnati con lo stesso indice) in una singola libreria e di sequenziarli su un singolo chip di sequenziamento. Un esempio potrebbe essere il sequenziamento di prodotti da diversi saggi Invivoscribe LymphoTrack Dx nella stessa corsa. Tuttavia, è importante ottenere un numero sufficiente di read, o profondità di copertura, per una valida interpretazione di ciascun campione.

Grazie alla capacità di Thermo Fisher Scientific Ion PGM Ion 316™ Chip v2 BC, che genera 2-3 milioni di read, si raccomanda di eseguire il multiplex su non più di tre diversi geni target contemporaneamente, quali *IGH* FR1, *IGH* FR2 e *IGH* FR3. Può essere eseguito il multiplexing contemporaneo di fino a cinque geni differenti su Ion PGM Ion 318™ Chip v2 BC (4-5,5 milioni di read), Ion S5 Ion 520™ Chip (3-6 milioni di read) e Ion S5 Ion 530™ Chip (15-20 milioni di read).

Quando si esegue il multiplexing di ampliconi di geni bersaglio diversi è importante utilizzare una chimica di sequenziamento adeguata. Il numero di cicli di sequenziamento deve essere sufficiente a sequenziare l'amplicone maggiore presente nella multiplex. Anche due o più librerie di sequenziamento generate a partire da master mix LymphoTrack Dx per gli stessi geni target (*ad es.* due librerie di sequenziamento di *IGH* FR1, ottenute sia con kit dello stesso lotto che di lotti diversi) possono essere sottoposte a multiplexing in una singola libreria di sequenziamento, purché ogni indice per quelle master mix sia incluso solo una volta per ogni corsa di sequenziamento.

3.6 Valutazione dell'ipermutazione somatica (SHM) di *IGHV*

Per la valutazione del tasso di ipermutazione somatica della regione *IGHV*, possono essere utilizzate le master mix LymphoTrack Dx *IGH* FR1; tuttavia, ciò permette di analizzare solo una porzione della regione *IGHV*, dal momento che la sequenza a monte del sito di legame dei primer non sarà valutata. Quando si analizza lo stato di ipermutazione somatica dei campioni, il software bioinformatico indica il tasso di mutazione in base alla percentuale di mancata corrispondenza degli ampliconi clonali rispetto ai geni di riferimento della linea germinale, fornisce una previsione sul fatto che la proteina sia o meno in frame e una previsione sul fatto che le mutazioni o i riarrangiamenti genici determinino o meno la formazione di un codone di stop prematuro e specifica la percentuale di copertura del gene *V_H* per la regione bersaglio del saggio.

4. Reagenti

4.1 Componenti del reagente

Tabella 1. Kit disponibili

N. di cat.	Descrizione	N. di master mix indicizzate	Reazioni totali
REF 91210007	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR1 Assay – S5/PGM	12 indici 5 corse di sequenziamento ciascuno	60
REF 91210037	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR2 Assay – S5/PGM	12 indici 5 corse di sequenziamento ciascuno	60
REF 91210047	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR3 Assay – S5/PGM	12 indici 5 corse di sequenziamento ciascuno	60
REF 91210057	LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR1/2/3 Assay – S5/PGM	12 indici 5 corse di sequenziamento ciascuno	60+60+60

Tabella 2. Componenti del kit LymphoTrack Dx *IGH* FR1 Assay

Reagenti	Componenti del reagente	Numero indice	Quantità unitaria	91210007 N. di unità	Temperatura di conservazione	Note
Master mix[†]	<i>IGH</i> FR1 S5/PGM 01	IonXpress_001	250 µl	1		N/A
	<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		
DNA di controllo positivo	<i>IGH</i> POS (+) (REF 40880009)	N/A	45 µl	2	 	DNA di <i>IGH</i> V1-46_03/ <i>IGH</i> J4_02 diluito in DNA tonsillare
DNA di controllo negativo	NGS NEG (-) (REF 40920018)	N/A	45 µl	2		DNA tonsillare, la frequenza massima delle sequenze può variare da lotto a lotto

Nota: Per la produzione di questi kit non sono stati utilizzati conservanti.

†Nota: In questo kit non sono utilizzati gli indici IonXpress 5 e 6.

Tabella 3. Componenti del kit LymphoTrack Dx IGH FR2 Assay

Reagenti	Componenti del reagente	Numero indice	Quantità unitaria	91210037 N. di unità	Temperatura di conservazione	Note
Master mix[†]	IGH FR2 S5/PGM 01	IonXpress_001	250 µl	1	 -85°C -65°C	N/A
	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		
DNA di controllo positivo	IGH POS (+) (REF 40880009)	N/A	45 µl	2	 2°C 8°C  -85°C -65°C	DNA di IGH V1-46_03/IGH J4_02 diluito in DNA tonsillare
DNA di controllo negativo	NGS NEG (-) (REF 40920018)	N/A	45 µl	2		DNA tonsillare, la frequenza massima delle sequenze può variare da lotto a lotto

Nota: Per la produzione di questi kit non sono stati utilizzati conservanti.

***Nota:** In questo kit non sono utilizzati gli indici IonXpress 5 e 6.

Tabella 4. Componenti del kit LymphoTrack Dx IGH FR3 Assay

Reagenti	Componenti del reagente	Numero indice	Quantità unitaria	91210047 N. di unità	Temperatura di conservazione	Note
Master mix[†]	IGH FR3 S5/PGM 01	IonXpress_001	250 µl	1	 -85°C -65°C	N/A
	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		
DNA di controllo positivo	IGH POS (+) (REF 40880009)	N/A	45 µl	2	 2°C 8°C  -85°C -65°C	DNA di IGH V1-46_03/IGH J4_02 diluito in DNA tonsillare
DNA di controllo negativo	NGS NEG (-) (REF 40920018)	N/A	45 µl	2		DNA tonsillare, la frequenza massima delle sequenze può variare da lotto a lotto

Nota: Per la produzione di questi kit non sono stati utilizzati conservanti.

***Nota:** In questo kit non sono utilizzati gli indici IonXpress 5 e 6.

Tabella 5. Componenti del kit LymphoTrack Dx IGH FR1/2/3 Assay

Master mix FR1 [‡]	N. di unità	Master mix FR2 [‡]	N. di unità	Master mix FR3 [‡]	N. di unità	Numero indice	Quantità unitaria
IGH FR1 S5/PGM 01	1	IGH FR2 S5/PGM 01	1	IGH FR3 S5/PGM 01	1	IonXpress_001	250 µl
IGH FR1 S5/PGM 02	1	IGH FR2 S5/PGM 02	1	IGH FR3 S5/PGM 02	1	IonXpress_002	
IGH FR1 S5/PGM 03	1	IGH FR2 S5/PGM 03	1	IGH FR3 S5/PGM 03	1	IonXpress_003	
IGH FR1 S5/PGM 04	1	IGH FR2 S5/PGM 04	1	IGH FR3 S5/PGM 04	1	IonXpress_004	
IGH FR1 S5/PGM 07	1	IGH FR2 S5/PGM 07	1	IGH FR3 S5/PGM 07	1	IonXpress_007	
IGH FR1 S5/PGM 08	1	IGH FR2 S5/PGM 08	1	IGH FR3 S5/PGM 08	1	IonXpress_008	
IGH FR1 S5/PGM 09	1	IGH FR2 S5/PGM 09	1	IGH FR3 S5/PGM 09	1	IonXpress_009	
IGH FR1 S5/PGM 10	1	IGH FR2 S5/PGM 10	1	IGH FR3 S5/PGM 10	1	IonXpress_010	
IGH FR1 S5/PGM 11	1	IGH FR2 S5/PGM 11	1	IGH FR3 S5/PGM 11	1	IonXpress_011	
IGH FR1 S5/PGM 12	1	IGH FR2 S5/PGM 12	1	IGH FR3 S5/PGM 12	1	IonXpress_012	
IGH FR1 S5/PGM 13	1	IGH FR2 S5/PGM 13	1	IGH FR3 S5/PGM 13	1	IonXpress_013	
IGH FR1 S5/PGM 14	1	IGH FR2 S5/PGM 14	1	IGH FR3 S5/PGM 14	1	IonXpress_014	
Reagenti	Componenti del reagente			Note		N. di unità	Quantità unitaria
DNA di controllo positivo*	IGH POS (+) (REF 40880009)			DNA di IGH V1-46_03/IGH J4_02 diluito in DNA tonsillare		4	45 µl
DNA di controllo negativo*	NGS NEG (-) (REF 40920018)			DNA tonsillare, la frequenza massima delle sequenze può variare da lotto a lotto		4	45 µl

***Nota:** La temperatura di conservazione delle master mix è tra -85°C e -65°C.
***Nota:** La temperatura di conservazione dei controlli è tra 2°C e 8°C oppure tra -85°C e -65°C.
Nota: Per la produzione di questi kit non sono stati utilizzati conservanti.
***Nota:** In questo kit non sono utilizzati gli indici IonXpress 5 e 6.

4.2 Avvertenze e precauzioni



Leggere attentamente le Istruzioni per l'uso prima di iniziare la procedura di analisi e seguire attentamente ogni passaggio.

- **IVD** Questo prodotto è per uso diagnostico *in vitro*.
- Utilizzare questo saggio come un sistema. Non utilizzare reagenti di altri produttori. La diluizione, la riduzione delle reazioni di amplificazione o altre deviazioni da questo protocollo possono influire sulle prestazioni di questo test e/o invalidare eventuali sublicenze limitate concesse con l'acquisto di questi kit.
- I materiali sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando conservati e maneggiati come indicato. Non utilizzare i kit oltre la data di scadenza.
- Il rigoroso rispetto del protocollo garantisce prestazioni e riproducibilità ottimali. Utilizzare i programmi del termociclatore corretti, poiché altri programmi potrebbero fornire dati imprecisi/errati, come risultati falsi positivi e falsi negativi.
- Non mescolare o combinare reagenti provenienti da kit con numeri di lotto diversi.
- Smaltire i reagenti inutilizzati e i rifiuti in conformità alle normative nazionali, federali, statali e locali.
- Tutte le procedure di laboratorio devono essere eseguite con dispositivi di protezione individuale standard (guanti, camici da laboratorio e occhiali protettivi). Seguire le buone pratiche di laboratorio e le precauzioni universali quando si lavora con i campioni. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere o fumare nelle aree di lavoro del laboratorio. Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato i campioni e i reagenti del saggio. I campioni devono essere maneggiati in strutture di contenimento di biosicurezza approvate e aperti solo in cappe di biosicurezza certificate. Per la preparazione del DNA del campione utilizzare solamente acqua per biologia molecolare.
- A causa dell'elevata sensibilità analitica di questi test, è necessario prestare estrema attenzione per evitare qualsiasi contaminazione dei reagenti o delle miscele di amplificazione con campioni, controlli o materiali amplificati. Utilizzare puntali per pipette resistenti agli aerosol e cambiare il puntale tra un campione e l'altro e tra una dispensazione di reagenti e l'altra. Tutti i reagenti devono essere attentamente monitorati per la presenza di segni di contaminazione (es. controlli negativi che danno segnali positivi). Smaltire tutti i reagenti di cui si sospetta la contaminazione.
- Per ridurre al minimo la contaminazione, indossare guanti puliti quando si maneggiano campioni e reagenti e pulire regolarmente le aree di lavoro e le pipette prima di preparare la PCR.
- Il flusso di lavoro nel laboratorio di PCR deve essere unidirezionale tra le distinte aree di lavoro: iniziare con la preparazione della master mix, passare alla preparazione del campione, quindi all'amplificazione e infine al rilevamento. La sterilizzazione in autoclave non elimina la contaminazione del DNA. Eseguire i passaggi pre- e post-PCR in aree separate. Evitare di portare carta e altro materiale dall'area post-PCR all'area pre-PCR.
- Tutte le pipette, i puntali delle pipette e qualsiasi apparecchiatura utilizzata in una determinata area devono essere dedicati a quella zona del laboratorio.
- Gli articoli che non sono monouso devono essere decontaminati in candeggina al 10% e risciacquati con acqua distillata due volte in due momenti diversi prima di riportarli nelle aree di partenza.
- Quando possibile, utilizzare materiale da laboratorio in plastica sterile usa e getta per evitare la contaminazione.

4.3 Conservazione e manipolazione

- Conservare il saggio tra **-85°C e -65°C** fino al momento dell'utilizzo.
- La temperatura di conservazione ottimale per i controlli di DNA è di 2°C e 8°C, ma il DNA può anche essere conservato a una temperatura compresa fra -85°C e -65°C.
- Tutti i reagenti e i controlli devono essere scongelati e passati al vortex o mescolati accuratamente prima dell'uso per garantire che siano completamente risospesi.
- A causa delle elevate concentrazioni di sali, le master mix per PCR sono sensibili ai cicli di congelamento/scongelamento. Il numero di cicli deve essere limitato a un massimo di cinque.

Per eventuali domande, rivolgersi al personale tecnico Invivoscribe. Saremo lieti di aiutare ciascun utente a stabilire le proprie esigenze di conservazione ottimali.

5. Strumenti

Gli strumenti elencati in Tabella 6 sono raccomandati per l'uso con le seguenti combinazioni di piattaforme validate per la preparazione della libreria e il sequenziamento con LymphoTrack Dx *IGH* (FR1/FR2/FR3) Assay – S5/PGM:

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

Tabella 6. Strumenti raccomandati.

Funzione dello strumento	Combinazione della piattaforma validata con strumenti raccomandati / Specifiche		
	Ion Chef e Ion S5	Ion OT2 e Ion S5	Ion OT2 e Ion PGM
Amplificazione dei campioni di DNA	Termociclatore Veriti™* o equivalente Intervallo termico minimo: da 15 °C a 96 °C Velocità di rampa minima: 0,8 °C/s Consultare la sezione 7.4 <i>Amplificazione</i> per il programma del termociclatore.		
Purificazione dei prodotti di PCR	Ambion® Magnetic Stand 96* (REF AM10027), Agencourt SPRIPlate® 96 Ring Super Magnet Plate* (REF A32782), Thermo Fisher Scientific DynaMag™-96 Side Skirted Magnet* (REF 12027) o equivalente Consultare la sezione 7.5. <i>Purificazione con AMPure XP</i> per i metodi di purificazione dei prodotti di PCR.		
Quantificazione dei prodotti di PCR purificati	Agilent 2100 Bioanalyzer* o Perkin Elmer LabChip GX* Consultare la sezione 7.6. <i>Quantificazione degli ampliconi</i> per ulteriori dettagli.		
Preparazione del template	Sistema Thermo Fisher Scientific Ion Chef* Consultare la sezione 7.9. <i>Preparazione del template e sequenziamento con Ion Chef e Ion S5</i> per ulteriori dettagli.	Sistema Thermo Fisher Scientific Ion OT2* Consultare la sezione 7.10. <i>Preparazione del template e sequenziamento con Ion OT2 e Ion S5</i> per ulteriori dettagli.	Sistema Thermo Fisher Scientific Ion OT2* Consultare la sezione 7.11. <i>Preparazione del template e sequenziamento con Ion OT2 e Ion PGM</i> per ulteriori dettagli.
Sequenziamento	Strumento Thermo Fisher Scientific Ion S5* Consultare le sezioni 7.9. <i>Preparazione del template e sequenziamento con Ion Chef e Ion S5</i> e 7.10. <i>Preparazione del template e sequenziamento con Ion OT2 e Ion S5</i> per ulteriori dettagli.		Strumento Thermo Fisher Scientific Ion PGM* Consultare la sezione 7.11. <i>Preparazione del template e sequenziamento con Ion OT2 e Ion PGM</i> per ulteriori dettagli.

Nota: Seguire le procedure di installazione, utilizzo, calibrazione e manutenzione del produttore.

*Avvertenza: questi prodotti non sono provvisti di marchio CE

6. Raccolta e preparazione dei campioni

6.1 Precauzioni

I campioni biologici umani possono contenere materiali potenzialmente infettivi. Tutti i campioni devono essere maneggiati conformemente agli standard riferibili ai patogeni a trasmissione ematica e/o al livello di biosicurezza 2 del proprio istituto.

6.2 Sostanze interferenti

È noto che le seguenti sostanze interferiscono con la PCR:

- Chelanti cationici divalenti
- Puntali per pipetta a bassa ritenzione
- EDTA (non significativo a basse concentrazioni)
- Eparina

6.3 Requisiti e manipolazione dei campioni

- La quantità di input minima è di 50 ng di DNA di alta qualità (5 µl di DNA del campione alla concentrazione minima di 10 ng/µl).
- Questo saggio permette di analizzare DNA genomico estratto e purificato. Il DNA deve essere quantificato con un metodo specifico per DNA a doppio filamento (dsDNA) ed essere privo di inibitori dell'amplificazione della PCR.
- Risospendere il DNA in una soluzione appropriata come TE 0,1X (Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0 preparata con acqua per biologia molecolare) o sola acqua per biologia molecolare.

6.4 Conservazione dei campioni

I campioni devono essere conservati utilizzando un metodo che eviti la degradazione del DNA.

7. Procedura del saggio

7.1 Materiali forniti

Consultare la Tabella 2 - Tabella 5 per l'elenco dei materiali forniti con ogni kit.

7.2 Materiali necessari (non forniti)

Tabella 7. Materiali necessari (non forniti)

Reagente/Materiale	Reagenti necessari e/o consigliati/Produttori	N. di catalogo	Note
DNA polimerasi	Roche: - DNA polimerasi EagleTaq™ Invivoscribe, Inc. - DNA polimerasi FalconTaq o equivalente	05206944190 60970130	5 U/μl
Acqua per biologia molecolare	N/A	N/A	Senza DNasi / RNasi
Acqua a 18 MΩ	N/A	N/A	Necessario per eseguire la PGM
Pipette calibrate	N/A	N/A	Devono essere in grado di misurare con precisione volumi compresi tra 0,2 μl e 1000 μl
Agitatore vortex	N/A	N/A	N/A
Piastre o provette per PCR	N/A	N/A	N/A
Puntali per pipette con filtro	N/A	N/A	Privi di RNasi, DNasi, apirogeni, sterili
Provette per microcentrifuga	N/A	N/A	Sterili
Kit di purificazione per PCR	Beckman Coulter®, Inc: Agencourt AMPure XP	A63880	N/A
Controllo positivo SHM	Invivoscribe, Inc.	40880008	Opzionale per test SHM
Ampliconi e libreria Quantificazione	Agilent Technologies: - Kit Agilent DNA 1000 o Perkin Elmer: - HT DNA 1K/12K/Hi Sens Labchip e Reagenti HT DNA HiSens	5067-1504 760517 & CLS760672	N/A
Sequenziamento Ion S5	Thermo Fisher Scientific: - Kit Ion 520 e Ion 530 – OT2 o - Kit Ion 510 e Ion 520 e Ion 530 – Chef	A27751 A34019	N/A
	Thermo Fisher Scientific: - Kit Ion 520 Chip o - Kit Ion 530 Chip	A27761 A27764	N/A
Sequenziamento Ion PGM	Thermo Fisher Scientific: Kit Ion PGM Hi-Q View OT2	A29900	N/A
	Thermo Fisher Scientific: Biglie per arricchimento Ion PGM	4478525	N/A
	Thermo Fisher Scientific: - Kit di sequenziamento Ion PGM Hi-Q View - e Kit Ion PGM Wash 2 Bottle	A30044 e A25591	N/A
	Thermo Fisher Scientific: - Ion 316 Chip Kit v2 BC o - Ion 318 Chip v2 BC	4488149 4488146	N/A
Software Torrent Suite™ per sistema Ion PGM o sistema Ion S5	Versione 5.0.4 o 5.2.2 per PGM* o Versione 5.6 per S5*	N/A	N/A

***Nota:** Queste versioni del software sono state usate per gli studi di validazione del saggio sugli strumenti specificati.

7.3 Preparazione dei reagenti

Per garantire che i campioni di DNA non contengano inibitori della PCR e siano di qualità e quantità sufficienti a dar luogo a un risultato valido, i campioni possono essere testati con la master mix dello Specimen Control Size Ladder di Invivoscribe (**REF** 20960021 per la rilevazione ABI o **REF** 20960020 per la rilevazione su gel). Lo Specimen Control Size Ladder ha come bersaglio vari geni e genera una serie di ampliconi di 100, 200, 300, 400 e 600 bp; il dimensionamento può variare di +/- 5 bp a causa delle dimensioni standard e/o delle differenze dello strumento. La verifica dell'integrità del DNA è particolarmente importante per campioni difficili, ad es. tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE).

Per assicurarsi che il saggio sia stato eseguito correttamente devono sempre essere **utilizzati controlli positivi e negativi. Predisporre sempre un controllo senza template (no template control, NTC)** per verificare l'eventuale presenza di contaminazione durante il processo di preparazione della PCR.

- 7.3.1 Indossando guanti, rimuovere le master mix dal congelatore. Lasciare scongelare le provette; quindi passarle delicatamente al vortex per mescolarle e poi centrifugarle molto brevemente.
- 7.3.2 In una cappa di contenimento o in una cappa per PCR pipettare 45 µl da ogni provetta di master mix in una piastra per PCR pulita (un pozzetto per ciascuna master mix e una master mix per campione).
 - Includere due controlli per ogni corsa (uno positivo e uno negativo) e un NTC.
 - Per l'NTC, utilizzare acqua per biologia molecolare come template anziché DNA.
- 7.3.3 Aggiungere 0,2 µl di DNA polimerasi Taq (a 5 U/µl) in ogni pozzetto contenente le master mix aliquotate.
- 7.3.4 Aggiungere 5 µl di DNA del campione (alla concentrazione minima di 10 ng/µl), DNA di controllo o acqua per biologia molecolare (NTC) ai singoli pozzetti contenenti le reazioni con le rispettive master mix.
 - Pipettare 5-10 volte su e giù per mescolare.
 - Sigillare la piastra, centrifugare brevemente e porre nel termociclatore.

Tabella 8. Preparazione della reazione

Reagente	Volume
Master mix	45,0 µl
DNA polimerasi Taq	0,2 µl
DNA del campione o di controllo	5,0 µl
Totale	50,2 µl

7.4 Amplificazione

- 7.4.1 Amplificare i campioni con il programma di PCR indicato nella Tabella 9.

Tabella 9. Programma di PCR

Fase	Temperatura	Durata	Ciclo
1	95 °C	7 minuti	1
2	95 °C	45 secondi	29x
3	60 °C	45 secondi	
4	72 °C	90 secondi	
5	72 °C	10 minuti	1
6	15 °C	∞	1

- 7.4.2 Una volta completato il programma di amplificazione, rimuovere la piastra per PCR amplificata dal termociclatore. Se non si procede immediatamente ai passaggi successivi, i prodotti di PCR possono essere conservati a 4 °C per 1 giorno.

7.5 Purificazione con AMPure XP

La purificazione dei prodotti di PCR dai campioni, dai controlli positivi e negativi e dai controlli senza template è stata eseguita durante la validazione del saggio utilizzando il sistema di purificazione per PCR Agencourt AMPure XP.

Preparazione:

- 7.5.1 Rimuovere il reagente AMPure XP dal frigorifero e lasciare che raggiunga la temperatura ambiente prima di usarlo. Agitare delicatamente il flacone di Agencourt AMPure XP per risospendere eventuali particelle magnetiche che potrebbero essersi depositate sul fondo.
- 7.5.2 Trasferire il volume appropriato di reagente Agencourt AMPure XP necessario per la piastra in una nuova provetta da 2 ml per ridurre al minimo il rischio di contaminazione da parte dei puntali delle pipette.
 - Il volume di reagente Agencourt AMPure XP necessario è uguale a $n \times 90 \mu\text{l}$ (n corrisponde al numero di campioni da purificare).
- 7.5.3 Preparare una soluzione madre fresca (0,5 ml per ogni campione da purificare) di etanolo al 70% utilizzando acqua sterile.

Legame degli ampliconi alle particelle magnetiche:

- 7.5.4 Aggiungere 90 μl del reagente Agencourt AMPure XP aliquotato, a **temperatura ambiente**, a ogni campione da purificare.
 - Mescolare pipettando su e giù 10 volte.
 - Dopo aver mescolato, il colore della miscela deve apparire omogeneo.
 - Incubare 5 minuti a temperatura ambiente.
- 7.5.5 Collocare i campioni mescolati su un supporto Ambion Magnetic Stand 96 e incubare a temperatura ambiente per 5 minuti per consentire alle particelle magnetiche di separarsi dalla soluzione.
 - Durante questa procedura, mantenere la piastra sul supporto magnetico per tutto il tempo, fino al passaggio 7.5.10 descritto di seguito.
- 7.5.6 Utilizzando una pipetta P200 (o una pipetta multicanale equivalente) impostata su 135 μl , aspirare il surnatante libero dalle particelle ed eliminarlo.
 - Utilizzare una pipetta P10 (o una pipetta multicanale equivalente) impostata su 10 μl per rimuovere eventuale surnatante in eccesso.
 - Evitare di rimuovere particelle magnetiche.

Lavaggio:

- 7.5.7 Con la piastra su un supporto magnetico, aggiungere 200 μl di etanolo al 70% a ciascun campione. Incubare per 30 secondi a temperatura ambiente.
 - Utilizzando una pipetta P200 (o una pipetta multicanale equivalente) impostata su 195 μl , aspirare l'etanolo ed eliminarlo.
 - Utilizzare una pipetta P10 (o una pipetta multicanale equivalente) impostata su 10 μl per rimuovere l'etanolo in eccesso.
 - Evitare di rimuovere particelle magnetiche.
- 7.5.8 Ripetere il passaggio 7.5.7 per un totale di due lavaggi.
- 7.5.9 Con la piastra ancora sul supporto magnetico, lasciare asciugare all'aria le particelle magnetiche per 5 minuti.

Eluizione:

- 7.5.10 Rimuovere la piastra dal supporto magnetico. Aggiungere 40 μl di tampone TE 1X.
 - Mescolare pipettando fino a ottenere una soluzione omogenea.
 - Accertarsi che tutte le particelle magnetiche siano in soluzione.
- 7.5.11 Incubare a temperatura ambiente per 2 minuti.
- 7.5.12 Posizionare la piastra sul supporto magnetico per almeno 5 minuti o fino a quando il surnatante non è libero dalle particelle.

7.5.13 Trasferire 35 µl di eluato su una nuova piastra e sigillarla con strip di tappi. Etichettare la piastra e centrifugare brevemente per accertarsi che il surnatante si trovi sul fondo del pozzetto.

- Conservare a -20 °C o procedere al passaggio successivo.

Le immagini dei gel nelle Figura 1 - Figura 3 illustrano l'efficacia di una tipica purificazione (mostrando gli ampliconi prima e dopo la purificazione) eseguita utilizzando, rispettivamente, le master mix *IGH* FR1, *IGH* FR2 e *IGH* FR3.

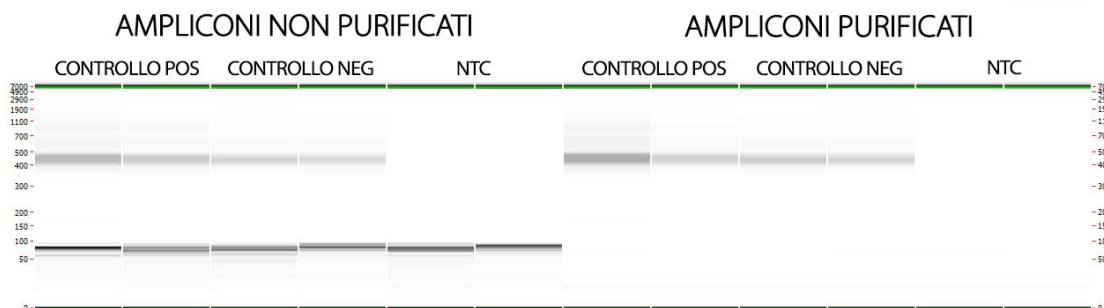


Figura 1: Esempio del risultato della purificazione di ampliconi ottenuti con le master mix *IGH* FR1 LymphoTrack Dx. L'immagine è stata generata analizzando prodotti non purificati e purificati sul sistema LabChip GX.

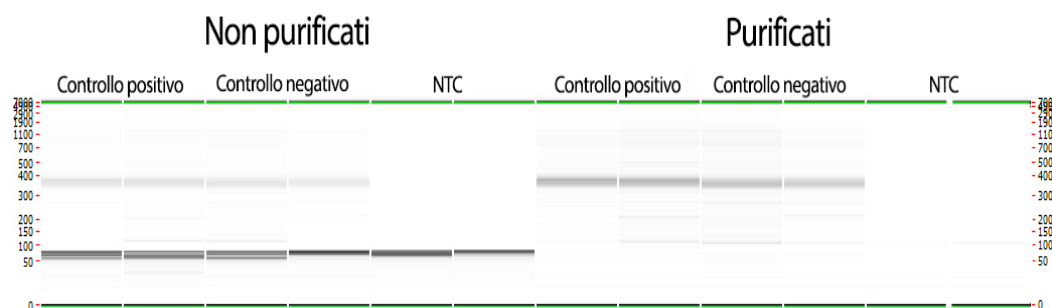


Figura 2: Esempio del risultato della purificazione di ampliconi ottenuti con le master mix *IGH* FR2 LymphoTrack Dx. L'immagine è stata generata analizzando prodotti non purificati e purificati sul sistema LabChip GX.

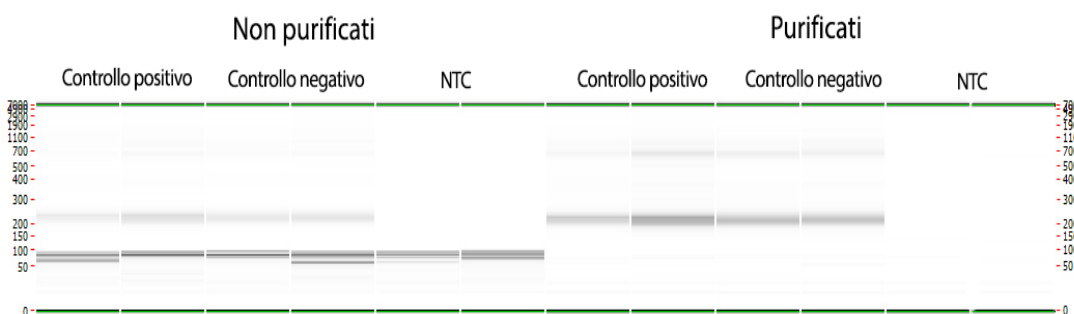


Figura 3: Esempio del risultato della purificazione di ampliconi ottenuti con le master mix *IGH* FR3 LymphoTrack Dx. L'immagine è stata generata analizzando prodotti non purificati e purificati sul sistema LabChip GX.

7.6 Quantificazione degli ampliconi

I seguenti passaggi sono stati eseguiti durante la validazione del saggio per analizzare i dati generati dai campioni, e dei controlli positivo, negativo e senza template, utilizzando Agilent 2100 Bioanalyzer, a partire dal passaggio 7.6.1 o Perkin Elmer LabChip GX, a partire dal passaggio 7.6.3.

Se si quantificano gli ampliconi di PCR purificati da diversi saggi LymphoTrack Dx, assicurarsi di analizzare ciascun bersaglio separatamente (compresi i diversi framework) dati i diversi range dimensionali di ciascun bersaglio del saggio.

Quantificazione con Agilent 2100 Bioanalyzer

Preparare un chip Agilent DNA 1000 (fare riferimento alle istruzioni per il kit Agilent DNA 1000 per maggiori dettagli).

Interpretazione del risultato:

7.6.1 L'elettroferogramma del pozzetto del ladder sarà simile a quello in Figura 4. Caratteristiche principali di una corsa di successo:

- 13 picchi per il DNA ladder 1000
- Tutti i picchi sono ben risolti
- Linea di base piatta
- Identificazione corretta di entrambi i marker

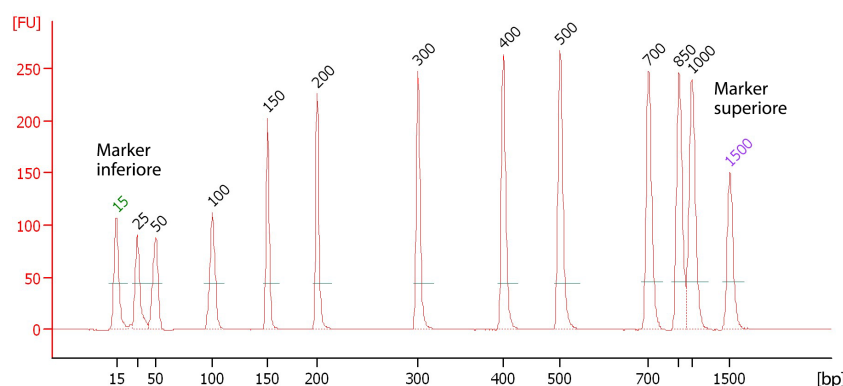


Figura 4: Esempio di elettroferogramma del pozzetto del ladder che mostra tutti i 13 picchi.

7.6.2 Determinare la concentrazione molare (nmol/l) di ciascun campione con il software del Bioanalyzer. Se necessario, usare l'integrazione manuale per posizionare l'intera gamma di frammenti della libreria in un singolo picco.

Quantificazione Perkin Elmer LabChip GX

Preparare il chip LabChip GX (fare riferimento alle istruzioni Perkin Elmer LabChip GX per ulteriori dettagli).

Interpretazione del risultato:

- 7.6.3 Come impostazione predefinita, ogni volta che si esegue un esperimento, il file di dati (*.gxd) viene salvato in una nuova cartella (il cui nome è la data attuale) alla quale si può accedere tramite il collegamento alla cartella Data (Dati) sul desktop.
- 7.6.4 Trasferire la cartella che contiene il file di dati (*.gxd) sul computer.
- 7.6.5 Aprire il software LabChip GX, andare alla barra dei menu e selezionare **File → Import Data (Importa dati)** per aprire il file di dati trasferito (*.gxd).
- 7.6.6 Nell'angolo superiore sinistro della schermata di trova il diagramma di una piastra. Selezionare i pozzetti utilizzati nell'esperimento per visualizzare i dati associati nelle tabelle di dati riportate di seguito. I pozzetti appaiono blu quando vengono selezionati.
- 7.6.7 Andare alla barra dei menu e selezionare **Analysis (Analisi) → Analysis Settings (Impostazioni analisi)**.
- Selezionare la scheda **Smear Analysis (Analisi dello striscio)** e aggiungere le informazioni dalla Tabella 10 - Tabella 12.
 - Una volta modificate tutte le informazioni, fare clic sul pulsante **Apply (Applica)**.

Tabella 10. Impostazioni per l'analisi dello striscio con IGH FR1

Dimensione iniziale (bp)	Dimensione finale (bp)	Colore	Nome	Proprietà visualizzata nella tabella dei pozzetti	Applicare ai pozzetti
350	600	Rosso	Regione [350-600]	Dimensione al massimo [bp]	<tutti>
350	600	Rosso	Regione [350-600]	Molarità (nmol/l)	<tutti>

Tabella 11. Impostazioni per l'analisi dello striscio con *IGH* FR2

Dimensione iniziale (bp)	Dimensione finale (bp)	Colore	Nome	Proprietà visualizzata nella tabella dei pozzetti	Applicare ai pozzetti
300	500	Rosso	Regione [300-500]	Dimensione al massimo [bp]	<tutti>
300	500	Rosso	Regione [300-500]	Molarità (nmol/l)	<tutti>

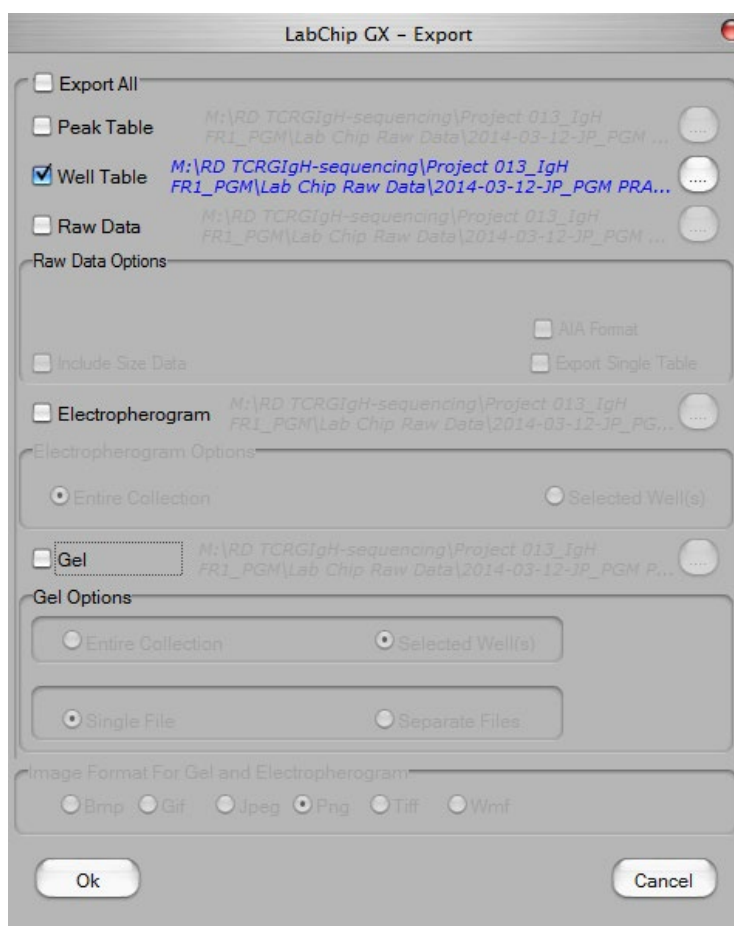
Tabella 12. Impostazioni per l'analisi dello striscio con *IGH* FR3

Dimensione iniziale (bp)	Dimensione finale (bp)	Colore	Nome	Proprietà visualizzata nella tabella dei pozzetti	Applicare ai pozzetti
150	300	Rosso	Regione [150-300]	Dimensione al massimo [bp]	<tutti>
150	300	Rosso	Regione [150-300]	Molarità (nmol/l)	<tutti>

7.6.8 Tornare alla schermata principale, andare alla barra dei menu e selezionare **File → Export (Esporta)**.

7.6.9 Controllare la *Well Table (Tabella dei pozzetti)* nella finestra a scomparsa (denominata LabChip GX – Export).

Figura 5: Esempio di finestra a scomparsa LabChip GX – Export.



7.6.10 Fare clic su **OK** per esportare come file *.csv.

7.6.11 Calcolare la concentrazione di ampliconi non diluiti moltiplicando il fattore di diluizione (50) per la concentrazione data da LabChip GX (nmol/l).

7.7 Pooling e quantificazione della libreria

La quantità di DNA della libreria caricata nell'emulsione PCR di Ion S5 o Ion PGM è critica per generare dati di alta qualità in una corsa di sequenziamento.

Gli ampliconi generati da uno o più saggi LymphoTrack Dx possono essere raggruppati in pool in una libreria per il sequenziamento utilizzando le istruzioni elencate di seguito.

- 7.7.1 In base alla concentrazione degli ampliconi calcolata dal Bioanalyzer o LabChip GX, aggiungere una **quantità uguale di ampliconi** (con l'eccezione del campione NTC).

- Ad es., combinare 10 µl di ampliconi a 4 nM ciascuno in una provetta; usando il tampone TE 1X come diluente.
- Passare al Vortex la provetta della libreria per 5-15 secondi e centrifugare per 3-5 secondi.

Se sono presenti campioni con concentrazione considerevolmente inferiore o superiore a 4 nM, variare i volumi di campione/tampone TE nella libreria per assicurarsi che venga pipettata una quantità di ampliconi uguale per campione.

7.8 Diluizione della libreria sottoposta a pooling

- 7.8.1 Determinare il fattore di diluizione del template che fornisce la concentrazione finale di ~20 pM (~12 x 10⁶ molecole per µl) usando la formula seguente:

Fattore di diluizione del template = (concentrazione della libreria in pM) / 20 pM

Esempio:

La concentrazione della libreria è 4 nM (4000 pM)

Fattore di diluizione del template = 4000 pM/20 pM = 200

Quindi, 1 µl di libreria mescolato con 199 µl di tampone TE 1X o acqua priva di nucleasi fornita col kit Ion PGM Hi-Q View OT2 (diluizione 1:200) produce circa 20 pM (~12 x 10⁶ molecole per µl).

Usare la libreria diluita entro 48 ore dalla preparazione.

7.9 Preparazione del template e sequenziamento con Ion Chef e Ion S5

Preparare e arricchire le particelle sferiche ioniche positive al template, seguito dal sequenziamento con Ion S5 in base alla guida per l'utente Thermo Fisher Scientific seguente:

- Kit Ion 510 e Ion 520 e Ion 530 – Chef ([REF](#) MAN0016854)

- 7.9.1 Creare una corsa pianificata seguendo la sezione 7.12

Tutti i passaggi relativi allo strumento, comprese le procedure di installazione, utilizzo, calibrazione, pulizia e manutenzione, vengono effettuati in base alle istruzioni del produttore.

7.10 Preparazione del template e sequenziamento con Ion OT2 e Ion S5

Preparare e arricchire le particelle sferiche ioniche positive al template usando OT2 seguito dal sequenziamento con Ion S5 in base alla guida per l'utente Thermo Fisher Scientific seguente:

- Kit Ion 520 e Ion 530 – OT2 ([REF](#) MAN0010844)

- 7.10.1 Creare una corsa pianificata seguendo la sezione 7.12

Tutti i passaggi relativi allo strumento, comprese le procedure di installazione, utilizzo, calibrazione, pulizia e manutenzione, vengono effettuati in base alle istruzioni del produttore.

7.11 Preparazione del template e sequenziamento con Ion OT2 e Ion PGM

Preparare e arricchire le particelle sferiche ioniche positive al template usando OT2 seguito dal sequenziamento con Ion PGM in base alle guide per l'utente Thermo Fisher Scientific seguenti:

- Kit Ion PGM Hi-Q View OT2 (REF MAN0014579)
- Kit di sequenziamento Ion PGM Hi-Q View (REF MAN0014583)

Tutti i passaggi relativi allo strumento, comprese le procedure di installazione, utilizzo, calibrazione, pulizia e manutenzione, vengono effettuati in base alle istruzioni del produttore, salvo diversamente specificato di seguito.

Nota: Non utilizzare la calibrazione standard Ion PGM.

7.11.1 Preparare il template usando Ion OT2

- Selezionare **PGM: Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit - 400** dal menu a discesa

7.11.2 Sequenziare la libreria usando Ion PGM

- Seguire la sezione 7.11.3 per il caricamento del chip
- Creare una corsa pianificata seguendo la sezione 7.12

7.11.3 Caricamento del chip Ion PGM

Seguire le istruzioni per il caricamento riportate di seguito per il caricamento ottimale del chip.

- 7.11.3.1. Seguendo Chip Check (Controllo chip) preparare il chip per il caricamento in base alle istruzioni del produttore.
- 7.11.3.2. Dopo avere regolato la pipetta per caricare le ISP (~30 µl) nel chip a una frequenza di ~1 µl al secondo, trasferire il chip nel cestello della microcentrifuga con la linguetta del chip rivolta all'interno (verso il centro della microcentrifuga).
 - Fare ruotare la microcentrifuga per 30 secondi con la linguetta del chip rivolta verso l'interno e poi rivolta verso l'esterno.
- 7.11.3.3. Battere con decisione il bordo della linguetta del chip sul banco per 2-3 volte. Per evitare di generare bolle, non estrarre il campione con la pipetta e quindi rimetterlo nel chip.
- 7.11.3.4. Inclinare il chip di 45° e rimuovere lentamente più liquido possibile dall'apertura di carico regolando di nuovo la pipetta. Eliminare il liquido.
- 7.11.3.5. Se rimane del liquido nel chip, eseguire una rapida centrifuga di 5 secondi con la linguetta del chip rivolta verso l'esterno e rimuovere ed eliminare eventuale liquido residuo. Non centrifugare il chip capovolto.
- 7.11.3.6. Se rimane del liquido nel chip dopo la centrifugazione breve, battere delicatamente e rapidamente il bordo della linguetta del chip alcune volte contro il banco e rimuovere ed eliminare il liquido raccolto. Non ripulire il chip. Procedere immediatamente a selezionare *Corsa pianificata ed Esecuzione della corsa* (sezione 7.12).

Nota: Le validazioni sono state eseguite seguendo le guide per l'utente seguenti Thermo Fisher Scientific indicate nella sezione 16: *Bibliografia* insieme alla procedura di caricamento del chip del cestello pesato. Dopo la fase di annealing del primer per il sequenziamento, la reazione è rimasta nel termociclatore a 15 °C invece che a temperatura ambiente.

Se si usa Torrent Suite Software v5.2.2 o v5.6, seguire la procedura in *Appendice A: Configurare il plugin di FileExporter e caricare i codici a barre personalizzati* per verificare la configurazione del plugin *FileExporter* e caricare i codici a barre personalizzati utilizzando il file *LymphoTrack_IonXpress.csv* incluso nel CD fornito (REF 95000007). Se si usa TSS v5.0.4, continuare al punto 7.12.

7.12 Creare una corsa pianificata.

- 7.12.1 Creare una corsa pianificata per **Ion S5** o **PGM**. Eseguire il login al browser Torrent per il server Torrent collegato al sistema.
- 7.12.2 Fare clic sulla scheda **Plan (Pianifica)** e quindi su **Generic Sequencing (Sequenziamento generico)** alla voce **Templates (Templati)**, e selezionare **Plan New Run (Pianifica nuova corsa)** in alto a destra.
- 7.12.3 Nella **Plan Run Wizard (Procedura guidata per corsa pianificata)**, esaminare ciascuna schermata e fare le selezioni appropriate seguendo la Tabella 13.
- 7.12.4 Selezionare **Planned Run (Corsa pianificata)** ed eseguire la corsa.

ATTENZIONE! Se si usa TSS v5.2.2 o v5.6 contattare il supporto tecnico Thermo Fisher per assistenza su come caricare i codici a barre.

Caratteri nel nome del campione:

Quando si denominano i campioni, assegnare a ogni campione un nome o identificatore univoco. Se si analizzano campioni duplicati, è possibile utilizzare un nome simile (*ovvero* Campione1a e Campione1b).

La mancata assegnazione di nomi univoci a campioni che saranno analizzati contemporaneamente sullo stesso chip farà sì che i risultati di diversi campioni verranno combinati dal LymphoTrack Dx Software – S5/PGM durante il processo di analisi.

È importante che i nomi dei file contengano solo i seguenti caratteri (A-Z, a-z, 0-9, „ _ (trattino basso), - (trattino)).

Se il software trova un carattere diverso da quelli indicati, o più spazi consecutivi, potrebbe verificarsi un errore.

Nome del campione per il multiplexing:

Ogni indice può essere riportato solo una volta nella corsa pianificata; pertanto qualsiasi informazione di tracciatura necessaria per i campioni sequenziati con più target che utilizzano lo stesso indice deve essere inclusa in un campo Sample Name (Nome campione) (che è incorporato nel nome del file FASTQ).

Si raccomanda di tenere traccia di tutti i campioni e target che vengono sequenziati utilizzando lo stesso indice in una corsa Ion S5 o Ion PGM. A questo set di campioni/target deve essere assegnato un identificatore univoco da includere nel campo Sample Name (Nome campione) della corsa pianificata.

Di seguito sono riportati esempi di nomi dei campioni che possono essere utilizzati ai fini della tracciatura:

- S1_FR1_FR2_FR3_IGK (un campione sequenziato con saggi multipli utilizzando lo stesso indice)
- S1_FR1_S4_TRG (campioni multipli sequenziati con saggi multipli utilizzando lo stesso indice)
- Pool02_IX002 (Pool 02 si riferisce a tutti i campioni/target sequenziati con IonXpress_002 e tracciati altrove)

Indici per il multiplexing:

Si noti che gli indici 5 e 6 di IonXpress non sono usati nei kit LymphoTrack Dx *IGH* (FR1, FR2, FR3) e *TRG* Assay e che gli indici 3, 5, 6, 7, e 15 non sono utilizzati nei kit LymphoTrack *IGK* Assay per Ion S5 e Ion PGM.

Tabella 13. Impostazioni di Run Plan Wizard (Procedura guidata per corsa pianificata) per combinazione di piattaforme.

Impostazione	Combinazione di piattaforme validata		
	Ion Chef e Ion S5	Ion OT2 e Ion S5	OT2 e Ion PGM
Ion Reporter	Ion Reporter – Nessuna Raggruppamento campioni – In bianco	Ion Reporter – Nessuna Raggruppamento campioni – In bianco	Ion Reporter – Nessuna Raggruppamento campioni – In bianco
Applicazione (ricerca)	Applicazione – DNA Tecnica target – Altro	Applicazione – DNA Tecnica target – Altro	Applicazione – DNA Tecnica target – Altro
Kit	Kit di preparazione campioni – Lasciare in bianco	Kit di preparazione campioni – Lasciare in bianco	Kit di preparazione campioni – Lasciare in bianco
	Tipo di kit libreria – Lasciare in bianco	Tipo di kit libreria – Lasciare in bianco	Tipo di kit libreria – Lasciare in bianco
	Kit templatato: ▪ Selezione strumento: Chef ▪ Kit Ion 510 e Ion 520 e Ion 530 – Chef	Kit templatato: ▪ Selezione strumento: OneTouch ▪ Kit Ion 520 e Ion 530 – OT2	Kit templatato: ▪ Selezione strumento: OneTouch ▪ Kit Ion PGM Hi-Q View OT2 - 400
	Kit di sequenziamento ▪ Kit Ion 510 e Ion 520 e Ion 530 – Chef	Kit di sequenziamento ▪ Kit Ion 520 e Ion 530 – OT2	Kit di sequenziamento ▪ Kit di sequenziamento Ion PGM Hi-Q View

Tabella 13. Impostazioni di Run Plan Wizard (Procedura guidata per corsa pianificata) per combinazione di piattaforme.

Impostazione	Combinazione di piattaforme validata		
	Ion Chef e Ion S5	Ion OT2 e Ion S5	OT2 e Ion PGM
Kit	Dimensione template – 400 bp	Dimensione template – 400 bp	N/A
	Flussi – 850	Flussi – 850	Flussi – 850
	Sequenza di controllo – Lasciare in bianco	Sequenza di controllo – Lasciare in bianco	Sequenza di controllo – Lasciare in bianco
	Tipo di chip: ▪ Ion 520 Chip o ▪ Ion 530 Chip	Tipo di chip: ▪ Ion 520 Chip o ▪ Ion 530 Chip	Tipo di chip: ▪ Ion 316 Chip v2 BC o ▪ Ion 318 Chip v2 BC
	Serie codici a barre – IonXpress o LymphoTrack_IonXpress ³	Serie codici a barre – IonXpress o LymphoTrack_IonXpress ³	Serie codici a barre – IonXpress o LymphoTrack_IonXpress ³
Plugin	Selezionare FileExporter ^{1,2}	Selezionare FileExporter ^{1,2}	Selezionare FileExporter ^{1,2}
Progetti	Selezionare la cartella Project (Progetto) appropriata per salvare la corsa o aggiungere un nuovo progetto	Selezionare la cartella Project (Progetto) appropriata per salvare la corsa o aggiungere un nuovo progetto	Selezionare la cartella Project (Progetto) appropriata per salvare la corsa o aggiungere un nuovo progetto
Nome template	Inserire il nome del template e aggiungere eventuali note	Inserire il nome del template e aggiungere eventuali note	Inserire il nome del template e aggiungere eventuali note
Riferimenti	Lasciare tutte le sezioni in bianco	Lasciare tutte le sezioni in bianco	Lasciare tutte le sezioni in bianco
Monitoraggio	Caricamento biglie (%) ≤ 30 Segnale chiave (1-100) ≤ 30 Sequenza utilizzabile (%) ≤ 30	Caricamento biglie (%) ≤ 30 Segnale chiave (1-100) ≤ 30 Sequenza utilizzabile (%) ≤ 30	Caricamento biglie (%) ≤ 30 Segnale chiave (1-100) ≤ 30 Sequenza utilizzabile (%) ≤ 30

¹**Nota:** Il plugin del software Torrent Suite™ versione 5.0.4 *FileExporter* potrebbe non generare il file FASTQ. Contattare il supporto tecnico Thermo Fisher per assistenza se si riceve il messaggio “DOCSTRING ERROR”.

²**Nota:** Evitare nomi lunghi per i file, perché potrebbero intervenire con il plugin *FileExporter*.

³**Nota:** Se si usa TSS v5.2 o v5.6, fare riferimento al file *LymphoTrack_IonXpress.csv* nel CD fornito (REF 95000007).

8. Analisi dei dati

I LymphoTrack Dx *IGH* (FR1/FR2/FR3) Assay – S5/PGM sono stati progettati per produrre dati di sequenziamento che possano essere analizzati utilizzando il LymphoTrack Dx Software – S5/PGM fornito nel CD associato (REF 95000007).

Questo CD include istruzioni dettagliate per l'installazione e l'uso del software.

I campioni preparati con LymphoTrack Dx *IGH* (FR1/FR2/FR3) Assay – S5/PGM generano file FASTQ che possono essere facilmente elaborati con l'applicazione LymphoTrack Dx Data Analysis.

Caratteri nel nome del file e del percorso:

1) Evitare spazi nel nome del percorso per i file di dati o il software (i nomi dei percorsi includono cartelle di file e nomi di file); non sono permessi più spazi consecutivi.

2) È importante che i nomi dei file contengano solo i seguenti caratteri (A-Z, a-z, 0-9, „ _ (trattino basso), - (trattino)).

Se il software trova un carattere diverso da quelli indicati, o più spazi consecutivi nel nome del file, potrebbe verificarsi un errore del LymphoTrack Dx Software – S5/PGM. Utilizzare solo questi caratteri quando si imposta una corsa pianificata.

9. Specifiche del saggio

I valori calcolati generati dal software sono arrotondati al decimo più prossimo per determinare i risultati del saggio.

- Validità della corsa S5 e PGM
 - Caricamento > 50%
 - Arricchimento > 50%
 - Clonale > 50%
- % più elevata di read per il controllo positivo di *IGH* $\geq 2,5\%$
- % più elevata di read per il controllo negativo dell'NGS < 1,0%
- % più elevata di read per il controllo positivo di SHM ([REF 40880008](#), può essere acquistato separatamente) di *IGH* $\geq 2,5\%$

10. Limiti della procedura

- Questo saggio non permette di identificare il 100% delle popolazioni cellulari clonali.
- I saggi basati su PCR sono soggetti a interferenze dovute a degradazione del DNA o inibizione dell'amplificazione della PCR a causa della possibile presenza di eparina o altri agenti nel campione analizzato.
- Un livello di varianza più elevato in corrispondenza o prossimo al limite di rilevamento (LoD) analitico è tipico in tutte le tecnologie, compreso il sequenziamento di nuova generazione. Si consigliano analisi di follow-up quando un risultato è prossimo al limite di rilevamento analitico del saggio.
- I risultati dei test molecolari di clonalità devono sempre essere interpretati nel contesto di dati clinici, istologici e immunofenotipici.

11. Interpretazione e refertazione

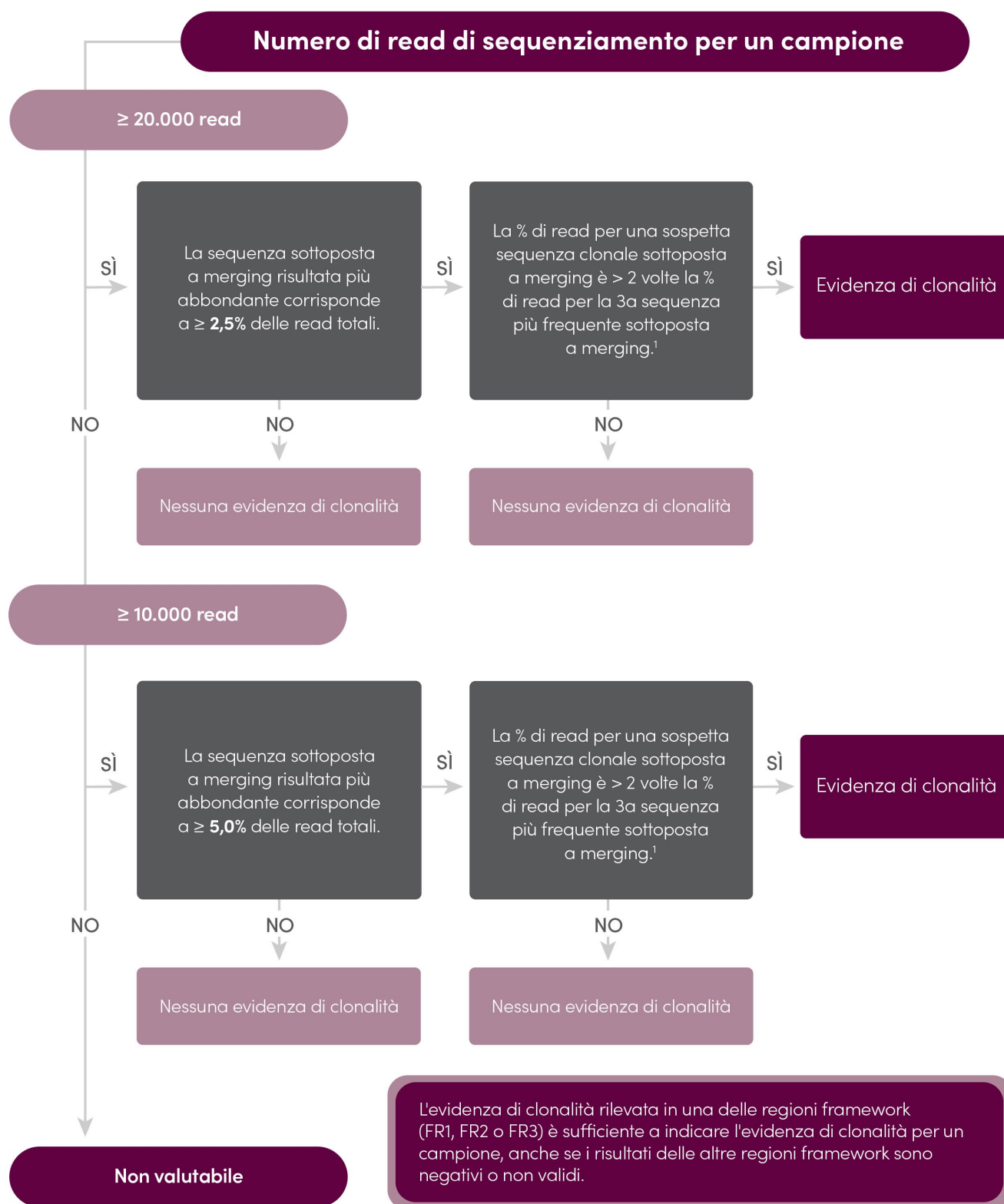
Usare il report *Merged Read Summary (Riepilogo delle read sottoposte a merging)* per identificare le sequenze delle read sottoposte a merging più abbondanti e le relative frequenze prima di procedere alla determinazione della clonalità utilizzando i criteri elencati di seguito. Fare riferimento alla sezione 8: *Analisi dei dati* per maggiori informazioni sul report *Merged Read Summary (Riepilogo delle read sottoposte a merging)*. Esistono alcuni processi clonali che potrebbero determinare il rilevamento di due o più cloni. Ciò si può verificare ad esempio nel caso di una popolazione dominante con una piccola popolazione sub-clonale o quando sono presenti più disturbi linfoproliferativi. È particolarmente importante che questi casi siano interpretati nell'ambito del relativo contesto clinico.

Per determinare l'evidenza di clonalità per un campione, occorre valutare i dati relativi a tutte e tre le regioni framework. L'evidenza di clonalità rilevata in una delle regioni framework (FR1, FR2 o FR3) è sufficiente a indicare l'evidenza di clonalità per un campione, anche se i risultati delle altre regioni framework sono negativi o non validi.

Tabella 14. Criteri di interpretazione

Criterio 1	Criterio 2	Criterio 3	Risultato
Il numero totale di read per ciascun campione è ≥ 20.000 .	La sequenza sottoposta a merging risultata più abbondante corrisponde a ≥ 2,5% delle read totali.	La % di read per una sospetta sequenza clonale sottoposta a merging è > 2 volte la % di read per la 3 ^a sequenza più frequente sottoposta a merging. ¹	EVIDENZA DI CLONALITÀ RILEVATA
		La % di read per una sospetta sequenza clonale sottoposta a merging è ≤ 2 volte la % di read per la 3 ^a sequenza più frequente sottoposta a merging. ¹	Nessuna evidenza di clonalità rilevata
	La sequenza sottoposta a merging risultata più abbondante corrisponde a < 2,5% delle read totali.	N/A	Nessuna evidenza di clonalità rilevata
Il numero totale di read per ciascun campione è ≥ 10.000 e < 20.000 .	La sequenza sottoposta a merging risultata più abbondante corrisponde a ≥ 5,0% delle read totali.	La % di read per una sospetta sequenza clonale sottoposta a merging è > 2 volte la % di read per la 3 ^a sequenza più frequente sottoposta a merging. ¹	EVIDENZA DI CLONALITÀ RILEVATA
		La % di read per una sospetta sequenza clonale sottoposta a merging è ≤ 2 volte la % di read per la 3 ^a sequenza più frequente sottoposta a merging. ¹	Nessuna evidenza di clonalità rilevata
	La sequenza sottoposta a merging risultata più abbondante corrisponde a < 5,0% delle read totali.	N/A	Nessuna evidenza di clonalità rilevata
Il numero totale di read per ciascun campione è < 10.000 .	N/A	N/A	Non valutabile

¹I valori calcolati generati dal software sono arrotondati al decimo a scopo comparativo.



¹I valori calcolati generati dal software sono arrotondati al decimo più prossimo a scopo comparativo.

Figura 6: Interpretazione dei dati in base ai criteri della Tabella 14.

Dopo la determinazione della clonalità, se necessario i campioni possono essere valutati utilizzando il LymphoTrack Dx *IGH* FR1 Assay – S5/PGM per l'evidenza di ipermutazione somatica (SHM). I criteri di interpretazione della SHM elencati di seguito sono suggerimenti per l'utilizzo dell'analisi della sequenza genica dell'immunoglobulina per la prognosi della LLC sulla base della letteratura corrente (Langerak *et al.*, 2011).

Per l'interpretazione della SHM, le due sequenze sottoposte a merging risultate più abbondanti devono essere entrambe valutate per l'evidenza di clonalità, utilizzando i criteri di interpretazione della clonalità riportati nella sezione precedente. Ogni sequenza sottoposta a merging che mostri evidenza di clonalità può essere valutata utilizzando i criteri per la SHM indicati di seguito (vedere la Figura 7 per il diagramma di flusso corrispondente). Per scopi prognostici, interpretare con cautela i riarrangiamenti con stato mutazionale prossimo o pari al valore soglia del 2%. I primer diretti *IGH* FR1 non si trovano nell'immediata estremità 5' della regione *IGHV*. Le mutazioni dei nucleotidi a monte del sito di legame del primer non saranno incluse nel tasso di mutazioni calcolato.

Tabella 15. Criteri di interpretazione della SHM consigliati

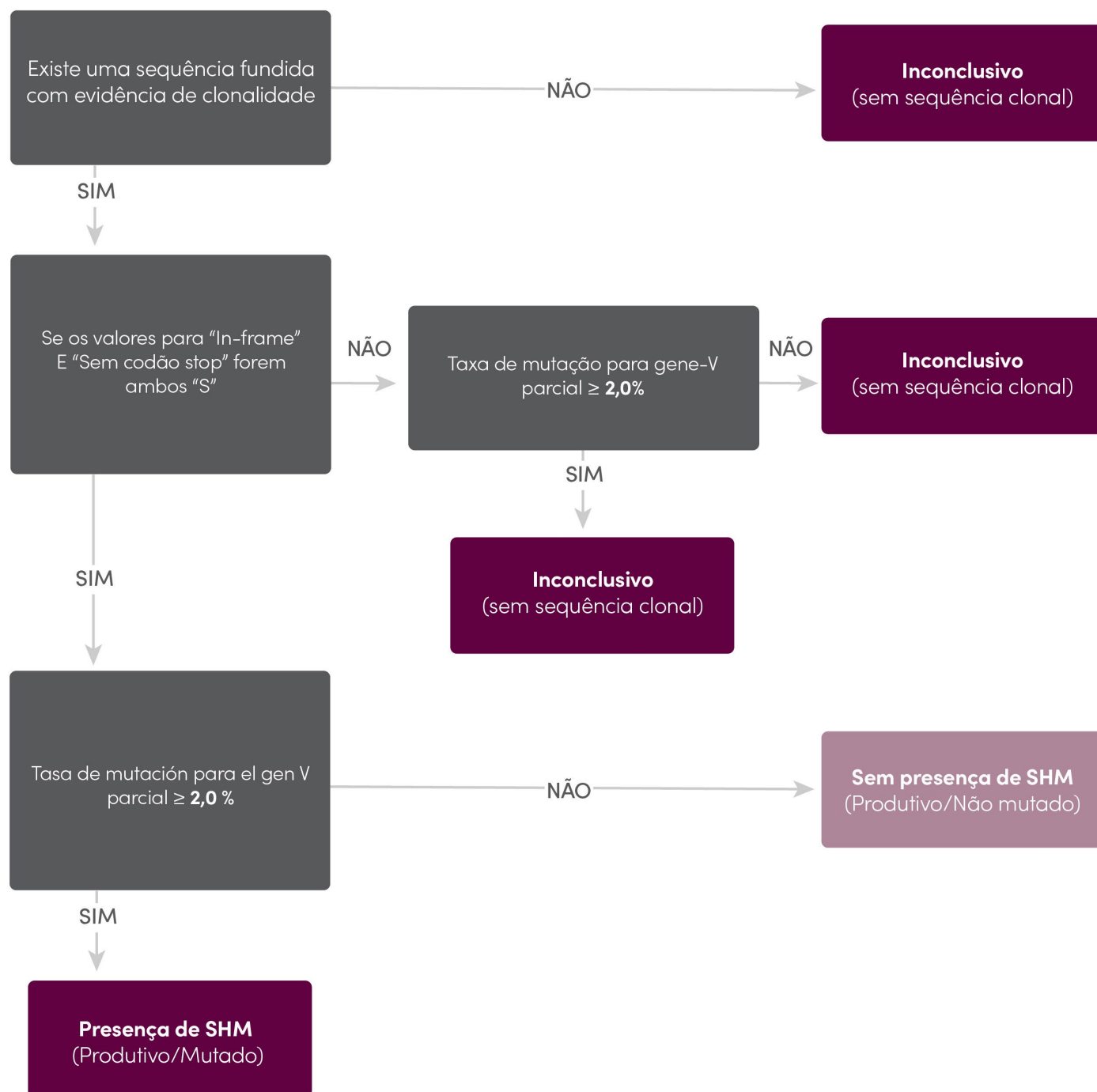
Criterio 1	Criterio 2	Criterio 4	Risultato
È presente una sequenza sottoposta a merging che mostra evidenza di clonalità.	Se i valori "In frame" E "Nessun codone di stop" sono entrambi "Y" (Sì)	Tasso di mutazione a gene V parziale $\geq 2.0\%$	PRESENZA DI SHM (Produttivo/Mutato)
		Tasso di mutazione a gene V parziale $< 2.0\%$	Assenza di SHM (Produttivo/Non mutato)
	Se uno o entrambi i valori "In frame" O "Nessun codone di stop" è/sono "N" (NO)	Tasso di mutazione a gene V parziale $\geq 2.0\%$	Inconclusivo (Non produttivo/Mutato)
		Tasso di mutazione a gene V parziale $< 2.0\%$	Inconclusivo (Non produttivo/Non mutato)
Non sono presenti sequenze sottoposte a merging che mostrano evidenza di clonalità.	N/A	N/A	Inconclusivo (nessuna sequenza clonale)

Se per un campione sono presenti due sequenze sottoposte a merging che mostrano entrambe evidenza di clonalità, ciascuna di esse deve essere valutata utilizzando la Tabella 16 per determinare il risultato finale per quanto riguarda la SHM di quel campione.

Tabella 16. Criteri di interpretazione della SHM consigliati in caso di doppio riarrangiamento

Criterio 1	Sequenza clonale A	Sequenza clonale B	Risultato
Doppio riarrangiamento	PRESENZA DI SHM (Produttivo/Mutato)	PRESENZA DI SHM (Produttivo/Mutato)	PRESENZA DI SHM
	PRESENZA DI SHM (Produttivo/Mutato)	Assenza di SHM (Produttivo/Non mutato)	Inconclusivo
	PRESENZA DI SHM (Produttivo/Mutato)	Inconclusivo (Non produttivo/Mutato)	PRESENZA DI SHM
	PRESENZA DI SHM (Produttivo/Mutato)	Inconclusivo (Non produttivo/Non mutato)	PRESENZA DI SHM
	Assenza di SHM (Produttivo/Non mutato)	Assenza di SHM (Produttivo/Non mutato)	Assenza di SHM
	Assenza di SHM (Produttivo/Non mutato)	Inconclusivo (Non produttivo/Mutato)	Inconclusivo
	Assenza di SHM (Produttivo/Non mutato)	Inconclusivo (Non produttivo/Non mutato)	Assenza di SHM
	Qualsiasi inconclusivo	Qualsiasi inconclusivo	Inconclusivo

Critérios de interpretação de SHM sugeridos



Nota: Se per un campione sono presenti due sequenze sottoposte a merging che mostrano entrambe evidenza di clonalità, ciascuna di esse deve essere valutata utilizzando la Tabella 16 per determinare il risultato finale per quanto riguarda la SHM di quel campione.

Figura 7: Interpretazione consigliata dei dati per determinare l'ipermutazione somatica (SHM) in base ai criteri indicati nella Tabella 15.

12. Dati del campione

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	TGTCATCTCCGGC ⁺	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	GCGAGAGTGGAT ⁺

Figura 8: Questa tabella, generata con LymphoTrack Reporter, mostra le 10 read più abbondanti del riepilogo delle read che sono state sottoposte a merging con le 500 read più abbondanti; viene eseguita un’operazione di merging tra due read se la differenza tra di esse è di solo una o due bp. Le sequenze sono state generate con LymphoTrack Dx IGH FR1 Assay – S5/PGM e analizzate con LymphoTrack Dx Software – S5/PGM (REF 95000007).

13. Caratteristiche prestazionali

I risultati del LymphoTrack Dx IGH FR1 Assay - S5/PGM sono stati messi a confronto con la diagnosi clinica e la concordanza (o accordo percentuale globale), l’accordo percentuale positivo (PPA) e l’accordo percentuale negativo (NPA) sono stati, rispettivamente: 93% (27/29 casi), 88% e 100%.

Tabella 17. Confronto tra LymphoTrack Dx IGH FR1 Assay – S5/PGM e la diagnosi clinica

		Diagnosi clinica	
		Clonale	Non clonale
LymphoTrack Dx IGH FR1 Assay – S5/PGM	Clonale	15	2
	Non clonale	0	12

Le prestazioni analitiche del LymphoTrack Dx IGH FR1 Assay – S5/PGM sono state valutate analizzando il DNA di una linea cellulare clonale addizionato a DNA tonsillare a diverse diluizioni. Il limite di rilevamento (LoD) è stato osservato alla diluizione al 5% del DNA. La % più elevata di read relative al DNA tonsillare è stata < 1,0%. La regressione lineare R² è risultata > 0,99 per l’intervallo di diluizione del DNA dallo 0 al 10%. Il coefficiente di variazione (CV%) su 8 corse (per strumento, Ion S5 e Ion PGM) eseguite da 2 operatori, con 2 lotti di reagenti e 2 strumenti è stato inferiore al 10% per l’analisi delle diluizioni del DNA al 5% e al 10%.

Figura 9: Confronto del tasso di ipermutazione somatica (SHM) di 27 campioni determinato utilizzando il LymphoTrack Dx *IGH* FR1 Assay – S5/PGM e analizzato con il LymphoTrack Dx Software – S5/PGM o mediante l’analisi IMGT.

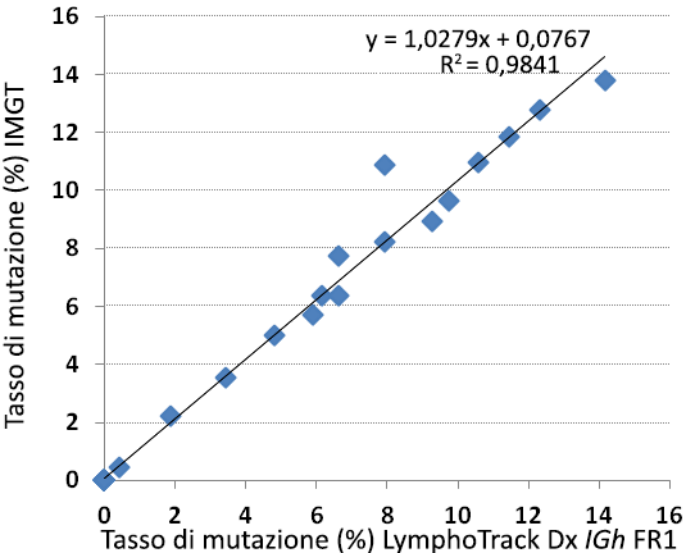


Tabella 18. Confronto tra i metodi di analisi dell’ipermutazione somatica (SHM) LymphoTrack Dx Software - S5/PGM e il metodo di controllo (IMGT).

		IMGT	
		Mutato	Non mutato
LymphoTrack Dx Software – S5/PGM	Mutato	14	0
	Non mutato	1	12

L’utilizzo del LymphoTrack Dx *IGH* FR1/2/3 Assay – S5/PGM ha migliorato l’identificazione degli eventi clonali rispetto all’analisi eseguita con il solo LymphoTrack Dx *IGH* FR1 Assay – S5/PGM. Il LymphoTrack Dx *IGH* FR1/2/3 Assay – S5/PGM e un saggio di elettroforesi capillare convenzionale (IdentiClone® *IGH* Gene Clonality Assay (Tube A+B+C) – rilevazione ABI, [REF 91010061](#)), sono stati messi a confronto e la concordanza (o accordo percentuale globale), l’accordo percentuale positivo (PPA) e l’accordo percentuale negativo (NPA) sono stati, rispettivamente: 98% (40/41 casi), 100% e 95%.

Tabella 19. Confronto tra LymphoTrack Dx *IGH* Assay – S5/PGM e IdentiClone *IGH* Gene Clonality Assay - ABI

		IdentiClone <i>IGH</i> Gene Clonality Assay - ABI	
		Clonale	Non clonale
LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR1/2/3 Assay – S5/PGM	Clonale	22	0
	Non clonale	1	18

14. Guida alla risoluzione dei problemi

Tabella 20. Risoluzione dei problemi

Fase in cui si verifica il problema	Errore	Azione
Preparazione del campione e dei reagenti	La quantità di DNA del campione è inferiore a 50 ng con un metodo basato su dsDNA	Non analizzare il campione
Preparazione del campione e dei reagenti	L'integrità del DNA del campione è bassa	Analizzare il campione utilizzando lo Specimen Control Size Ladder disponibile presso Invivoscribe (REF 20960021 per la rilevazione ABI o (REF 20960020 per la rilevazione su gel)
Creazione della libreria tramite quantificazione e pooling degli ampliconi	La concentrazione degli ampliconi è inferiore a 1 nM	Controllare il Bioanalyzer o LabChip GX Ladder e ripetere la PCR se inferiore a 1 nM.
Preparazione del template e inizializzazione S5 o PGM	N/A	Contattare l'Assistenza tecnica Thermo Fisher Scientific +1-800-831-6844
Installazione del CD	Il LymphoTrack Dx Software non si installa correttamente	Contattare l'Assistenza tecnica Invivoscribe +1-858-224-6600
Analisi dei dati	Il LymphoTrack Dx Software si blocca	Contattare l'Assistenza tecnica Invivoscribe +1-858-224-6600
Analisi dei dati	Impossibile eseguire la macro Excel	Contattare l'Assistenza tecnica Invivoscribe +1-858-224-6600
Analisi dei dati	Nessuna sequenza clonale rilevata per il controllo positivo	Contattare l'Assistenza tecnica Invivoscribe +1-858-224-6600
Controllo senza template (NTC)	Rilevamento di ampliconi NTC dopo la PCR	Ripetere il saggio

15. Assistenza tecnica e Assistenza clienti

Grazie per aver acquistato i LymphoTrack Dx *IGH* (FR1, FR2 e FR3) Assay – S5/PGM. I nostri clienti sono molto importanti per noi. Saremo lieti di assistervi nella comprensione del presente saggio e offriamo assistenza tecnica continua dal lunedì al venerdì per garantire che i saggi vengano eseguiti sempre con la massima efficienza nel vostro laboratorio.

Contatti



Invivoscribe, Inc

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | Stati Uniti d'America

Tel.: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Orario d'ufficio: 7:00 – 17:00 (fuso orario del Pacifico)

Assistenza tecnica: support@invivoscribe.com | Servizio cliente: sales@invivoscribe.com | Sito web: www.invivoscribe.com

16. Bibliografia

- 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 KJ, *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. In 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.
- LymphoTrack Dx Software – S5/PGM package Istruzioni per l'uso (REF 95000007)
- Guida per l'utente: Kit Ion 510 e Ion 520 e Ion 530 – Chef (REF Man0016854, Rev. C.0)
- Guida per l'utente: Kit Ion 520 & Ion 530 – OT2 (REF Man0010844, Rev. D.0)
- Guida per l'utente: Kit Ion PGM Hi-Q View OT2 (REF Man0014579, Rev. A.0)
- Guida per l'utente: Kit di sequenziamento Ion PGM Hi-Q View (REF Man0014583, Rev. A.0)
- Guida per il Kit Agilent DNA 1000
- Manuale utente LabChip GX/GX II
- Guida per l'utente 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. Simboli

Sulle etichette dei prodotti diagnostici Invivoscribe NGS sono utilizzati i seguenti simboli.

	Numero di catalogo		Data di scadenza
	Volume del reagente		Rappresentante autorizzato nella Comunità europea
	Numero di lotto		Consultare le istruzioni per l'uso
	Condizioni di conservazione		Per uso diagnostico <i>in vitro</i>
	Identificatore Dispositivo Univoco		Produttore
	Conformità Britannica Valutata		Persona responsabile nel Regno Unito
	Rappresentante Autorizzato per la Svizzera		Conformità Europea

18. Avviso legale

Questo prodotto è coperto da uno o più dei seguenti brevetti e domande di brevetto di proprietà o concessi in licenza esclusiva a Invivoscribe, Inc. (IVS). Numero di brevetto statunitense 7,785,783, numero di brevetto statunitense 8,859,748 (unitamente alle rivendicazioni di domande divisionali relative alla stessa domanda originale), numero di brevetto europeo EP 1549764B1 (validato in 16 paesi e ampliato dai brevetti europei correlati con numero EP2418287A3 e EP 2460889A3), numero di brevetto giapponese JP04708029B2, numero di domanda di brevetto giapponese 2006-529437, numero di domanda di brevetto brasiliano PI0410283.5, numero di brevetto canadese CA2525122, numero di brevetto indiano IN243620, numero di brevetto messicano MX286493, numero di brevetto cinese CN1806051 e numero di brevetto coreano 101215194.

L'uso di questo prodotto può richiedere metodi di amplificazione degli acidi nucleici come la reazione a catena della polimerasi (PCR). Qualsiasi licenza necessaria per l'esecuzione di metodi di amplificazione o per l'uso di reagenti, enzimi di amplificazione o apparecchiature coperte da brevetti di terze parti è di responsabilità dell'utente e nessuna di tali licenze è concessa da Invivoscribe, Inc., espressamente o per implicazione.

©2023 Invivoscribe, Inc. Tutti i diritti riservati. I marchi commerciali menzionati nel presente documento sono di proprietà di Invivoscribe, Inc. e/o delle sue affiliate, o (per quanto riguarda i marchi commerciali di terzi utilizzati nel presente documento) dei rispettivi titolari.

19. LymphoTrack Dx IGH (FR1/FR2/FR3) Assay – S5: guida di una sola pagina

1. Indossando guanti, rimuovere le master mix dal congelatore. Utilizzare una master mix indicizzata diversa per ciascun campione e i controlli. Lasciare scongelare le provette master mix, quindi passarle delicatamente al vortex per mescolarle.
2. In una cappa di contenimento o una cappa per PCR, pipettare 45 µl di master mix nei singoli pozzetti di una piastra per PCR per i campioni e i controlli positivo, negativo e senza templat (un pozzetto per ciascuna master mix indicizzata).
3. Aggiungere 0,2 µl di DNA polimerasi Taq o equivalente (a 5 U/µl) a ciascuna master mix.
4. Aggiungere 5 µl di DNA del campione (alla concentrazione minima di 10 ng/µl) e 5 µl dei campioni di controllo nei pozzetti contenenti le reazioni con le rispettive master mix e pipettare su e giù 5-10 volte per mescolare.
5. Aggiungere 5 µl di acqua per biologia molecolare nel pozzetto contenente la rispettiva master mix per il controllo senza templat e pipettare su e giù 5-10 volte per mescolare.
6. Sigillare la piastra e amplificare il DNA bersaglio utilizzando il programma standard del termociclatore:

Fase	Temperatura	Durata	Ciclo
1	95°C	7 minuti	1
2	95°C	45 secondi	29x
3	60°C	45 secondi	
4	72°C	90 secondi	
5	72°C	10 minuti	1
6	15°C	∞	1

7. Rimuovere la piastra di amplificazione dal termociclatore.
8. Purificare i prodotti di PCR utilizzando il sistema di purificazione per PCR Agencourt AMPure XP. Aggiungere 90 µl di particelle per ogni 50 µl di reazione e quindi eluire il DNA purificato in 40 µl di tampone TE.
9. Quantificare gli ampliconi con un metodo appropriato (ad es., Agilent 2100 Bioanalyzer o LabChip GX).
10. In base alla quantificazione, combinare una quantità uguale di ciascun amplicone in una provetta (non includere il controllo senza templat); usare il tampone TE per portare il volume totale a 10 µl per master mix. Passare delicatamente al vortex per mescolare e poi centrifugare brevemente.
11. Diluire la libreria a 20 pM con acqua priva di nucleasi.
12. Eseguire la PCR in emulsione per preparare il templat utilizzando Ion Chef o Ion OT2 accoppiati con gli strumenti Ion ES.
 - a. Usando lo strumento Ion Chef con il kit Ion 510 e Ion 520 e Ion 530 – Chef o
 - b. Usando lo strumento Ion OneTouch con il kit Ion 520 e Ion 530 – OT2
13. Inizializzare Ion S5 e caricare il chip Ion 520 o Ion 530 con le ISP.
14. Creare una corsa pianificata con il browser Torrent.
15. Avviare la corsa Ion S5.
16. Analizzare e visualizzare i dati acquisiti utilizzando il pacchetto LymphoTrack Dx Software – S5/PGM associato.

20. LymphoTrack Dx IGH (FR1/FR2/FR3) Assay – PGM: guida di una sola pagina

1. Indossando guanti, rimuovere le master mix dal congelatore. Utilizzare una master mix indicizzata diversa per ciascun campione e i controlli. Lasciare scongelare le provette master mix, quindi passarle delicatamente al vortex per mescolarle.
2. In una cappa di contenimento o una cappa per PCR, pipettare 45 µl di master mix nei singoli pozzetti di una piastra PCR per i campioni e i controlli positivo, negativo e senza templat (un pozzetto per ciascuna master mix indicizzata).
3. Aggiungere 0,2 µl di DNA polimerasi Taq (a 5 U/µl) a ciascuna master mix.
4. Aggiungere 5 µl di DNA del campione (alla concentrazione minima di 10 ng/µl) e 5 µl dei campioni di controllo nei pozzetti contenenti le reazioni con le rispettive master mix e pipettare su e giù 5-10 volte per mescolare.
5. Aggiungere 5 µl di acqua per biologia molecolare nel pozzetto contenente la rispettiva master mix per il controllo senza templat e pipettare su e giù 5-10 volte per mescolare.
6. Sigillare la piastra e amplificare il DNA bersaglio utilizzando il programma standard del termociclatore:

Fase	Temperatura	Durata	Ciclo
1	95 °C	7 minuti	1
2	95 °C	45 secondi	29x
3	60 °C	45 secondi	
4	72 °C	90 secondi	
5	72 °C	10 minuti	1
6	15 °C	∞	1

7. Rimuovere la piastra di amplificazione dal termociclatore.
8. Purificare i prodotti di PCR utilizzando il sistema di purificazione per PCR Agencourt AMPure XP. Aggiungere 90 µl di particelle per ogni 50 µl di reazione e quindi eluire il DNA purificato in 40 µl di tampone TE.
9. Quantificare gli ampliconi con un metodo appropriato (*ad es.*, Agilent 2100 Bioanalyzer o LabChip GX).
10. In base alla quantificazione, combinare una quantità uguale di ciascun amplicone in una provetta (non includere il controllo senza templat); usare il tampone TE per portare il volume totale a 10 µl per master mix. Passare delicatamente al vortex per mescolare e poi centrifugare brevemente.
11. Diluire la libreria a 20 pM con il tampone TE 1X o acqua priva di nucleasi fornita con il kit Hi-Q View OT2.
12. Con lo strumento Ion OneTouch 2 con il kit Ion PGM Hi-Q View OT2, eseguire una PCR in emulsione per creare particelle sferiche ioniche (ISP) positive al templat.
13. Arricchire le ISP positive al templat con Ion OneTouch ES.
14. Inizializzare Ion PGM e caricare il chip Ion 316 v2 BC (o Ion 318 v2 BC) con le ISP.
15. Creare una corsa pianificata con il browser Torrent.
16. Avviare la corsa Ion PGM.
17. Analizzare e visualizzare i dati acquisiti utilizzando il pacchetto LymphoTrack Dx Software – S5/PGM associato.

21. Appendice A: Configurare il plugin di *FileExporter* e caricare i codici a barre personalizzati

Se si usa Torrent Suite Software v5.2.2 o v5.6, configurare il plugin di *FileExporter* e caricare i codici a barre personalizzati usando il file *LymphoTrack_IonXpress.csv* incluso nel CD fornito (REF 9-500-0007).

21.1 Verificare la configurazione del plugin di *FileExporter*.

- 21.1.1 Eseguire il login al software Torrent Suite come amministratore.
- 21.1.2 Verificare la corretta configurazione del plugin di *FileExporter*.
 - Dall'icona dell'ingranaggio () sulla *schermata Home di Torrent Suite Server* selezionare **Plugins (Plugin)** dal menu a discesa.
 - Trovare il plugin *FileExporter* e fare clic sull'icona dell'ingranaggio, quindi selezionare **Configure (Configura)** (si apre la finestra di configurazione).
 - Alla voce **File > Options (Opzioni)**: controllare le caselle FASTQ.
 - Per Archive Type (Tipo di archiviazione), selezionare **Zip**.
 - Selezionare la Naming Option (Opzione di denominazione) preferita.
 - Salvare la configurazione.
- 21.1.3 Verificare la **Change Plugin Configuration** (Modifica configurazione del plugin) per il plugin di *FileExporter*.
 - Fare clic sull'icona dell'ingranaggio () e selezionare **Configure (Configura)**.
 - Scorrere e fare clic su Admin Interface (Interfaccia amministratore).
 - Scorrere e fare clic su **Plugins (Plugin)** sul lato sinistro, e selezionare **FileExporter**.
 - Verificare che le sezioni per *Status (Stato)* e *Userinputfields (Campi di input utente)* visualizzino { }, altrimenti, cancellare i contenuti fino alla visualizzazione di { }. Non modificare nessun altro parametro (che non si menzionato qui).
 - Selezionare **Save (Salva)**.

21.2 Load Custom Barcodes (Carica codici a barre personalizzati).

- 21.2.1 Eseguire il login al software Torrent Suite come amministratore.
 - Selezionare l'icona dell'ingranaggio () e selezionare **References (Bibliografia)** dal menu a discesa.
 - Selezionare Barcodes (Codici a barre) e quindi Add new DNA Barcodes (Aggiungi nuovi codici a barre DNA).
 - Selezionare **Choose File (Scegli file)** e caricare il file *LymphoTrack_IonXpress.csv*
 - Dare un nome a *Barcode set name (Imposta nome codice a barre)* (es. *LymphoTrack_IonXpress*) e fare clic su **Upload (Carica)**.
 - Questo nome di codice a barre sarà utilizzato per tutti i saggi LymphoTrack nell'impostazione della corsa.
 - Verificare che i nuovi codici a barre aggiunti siano mostrati nel menu **Barcodes (Codici a barre)**.
- 21.2.2 Procedere al punto 7.12 *Creare una corsa pianificata*.