

Istruzioni per l'uso



IdentiClone® *IGH* + *IGK* B-Cell Clonality Assay

Per l'identificazione dei riarrangiamenti clonali dei geni codificanti per la catena pesante e la catena leggera kappa delle immunoglobuline.

IVD Per uso diagnostico *in vitro*.



 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 9100031	IdentiClone <i>IGH</i> + <i>IGK</i> B-Cell Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 reazioni
REF 9100041	IdentiClone <i>IGH</i> + <i>IGK</i> B-Cell Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 reazioni

Indice

1.	DESTINAZIONE D'USO.....	3
2.	SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST	3
2.1.	Contesto	3
2.2.	Sommario.....	3
3.	PRINCIPI DELLA PROCEDURA	4
3.1.	Reazione a catena della polimerasi (PCR)	4
3.2.	Rilevamento di fluorescenza differenziale.....	5
4.	REAGENTI.....	5
4.1.	Componenti del reagente	5
4.2.	Avvertenze e precauzioni.....	6
4.3.	Conservazione e manipolazione.....	6
5.	STRUMENTI	7
5.1.	Termociclatore	7
5.2.	Strumenti per elettroforesi capillare ABI.....	7
6.	RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	8
6.1.	Precauzioni	8
6.2.	Sostanze interferenti.....	8
6.3.	Requisiti e manipolazione dei campioni	8
6.4.	Preparazione dei campioni.....	8
6.5.	Conservazione dei campioni	8
7.	PROCEDURA DEL SAGGIO.....	9
7.1.	Materiali forniti.....	9
7.2.	Materiali necessari (non forniti)	9
7.3.	Preparazione dei reagenti.....	10
7.4.	Amplificazione.....	11
7.5.	Rilevamento della fluorescenza ABI	12
7.6.	Controllo di qualità.....	13
7.7.	Controlli positivi raccomandati	13
8.	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI	14
8.1.	Analisi.....	14
8.2.	Interpretazione del campione	14
9.	LIMITI DELLA PROCEDURA.....	15
10.	VALORI ATTESI.....	15
10.1.	Dimensione attesa dei prodotti amplificati	15
10.2.	Dati del campione	16
11.	CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI.....	17
12.	BIBLIOGRAFIA.....	17
13.	ASSISTENZA TECNICA E SERVIZIO CLIENTI	17
14.	SIMBOLI	18
15.	AVVISO LEGALE	18
15.1.	Garanzia e dichiarazione di responsabilità	18
15.2.	Brevetti e marchi commerciali	18

1. Destinazione d'uso

IdentiClone *IGH + IGK* B-Cell Clonality Assay è un prodotto per la diagnostica *in vitro* ideato per il rilevamento, basato su PCR, dei riarrangiamenti clonali dei geni codificanti per la catena pesante e la catena leggera kappa delle immunoglobuline in pazienti con sospette linfoproliferazioni. In particolare, *IGH + IGK* B-Cell Clonality Assay può essere utilizzato per:

- identificare clonalità nei disturbi linfoproliferativi atipici
- supportare la diagnosi differenziale tra lesioni reattive e neoplasie ematologiche⁴
- assegnare una linea cellulare presuntiva nei disordini linfoproliferativi monoclonali maturi
- identificare i marcatori tumorali specifici (riarrangiamenti genici di *IGH* e *IGK*) per il monitoraggio post-trattamento
- monitorare e valutare la ricorrenza della malattia

2. Sommario e spiegazione del test

2.1. Contesto

I riarrangiamenti dei geni che codificano per i recettori antigenici si verificano durante l'ontogenesi nei linfociti B e T. Questi riarrangiamenti genici generano prodotti che sono unici in lunghezza e sequenza per ciascuna cellula. Pertanto, i saggi di reazione a catena della polimerasi (PCR) possono servire per identificare popolazioni linfocitarie derivate da una singola cellula, rilevando le ricombinazioni uniche dei geni V-J presenti all'interno di questi loci del recettore antigenico.¹ Questi saggi PCR IdentiClone impiegano primer multipli di DNA consenso che identificano regioni genetiche conservate target, all'interno dei geni codificanti per la catena pesante e la catena leggera delle immunoglobuline. Questo test viene utilizzato per rilevare la maggior parte delle neoplasie clonali dei linfociti B a partire dal DNA. I prodotti del test possono essere analizzati usando vari sistemi di rilevamento, compresa l'elettroforesi su gel e capillare.

I saggi IdentiClone di Invivoscribe rappresentano un nuovo approccio alle analisi di clonalità basate su PCR. Queste analisi standardizzate sono state ottimizzate accuratamente mediante test su campioni di controllo positivi e negativi, utilizzando master mix multiplex. Allo sviluppo dei test è seguita la convalida esaustiva che ha incluso l'analisi di oltre 400 campioni clinici usando la classificazione Revised European/American Lymphoma (REAL). Le prove sono state eseguite in oltre trenta centri di test indipendenti all'avanguardia in tutta Europa, in uno studio collaborativo chiamato BIOMED-2 Concerted Action. I risultati dello studio BIOMED-2 indicano che i riarrangiamenti genici di *IGH* e *IGK* potrebbero migliorare l'affidabilità e la sensibilità dei test.² Inoltre, le prove per entrambi i riarrangiamenti genici di *IGH* e *IGK* hanno prodotto una sensibilità del 99%, rispetto all'88% di *IGH* e all'88% di *IGK* analizzati individualmente. Ciò può aumentare l'affidabilità dei test poiché è più probabile che i prodotti clonali siano rilevati in più di una provetta.⁴

Le analisi basate su rilevamento ABI non sono in grado di rilevare, in maniera affidabile, popolazioni clonali che comprendono meno dell'1% della popolazione totale delle cellule linfocitarie. I risultati dei test molecolari di clonalità devono sempre essere interpretati nel contesto di dati clinici, istologici e immunofenotipici.

2.2. Sommario

Questo kit del test comprende sei (6) master mix. Le master mix *IGH* Tube A, B, e C (Provette *IGH* A, B e C) servono per identificare le regioni framework 1, 2 e 3 (rispettivamente) all'interno delle regioni variabile e di giunzione del locus della catena pesante delle immunoglobuline. La master mix *IGK* Tube A (Provetta *IGK* A) serve per identificare le regioni target variabile (V) e di giunzione (J) del locus della catena leggera kappa delle Ig. Invece, la master mix *IGK* Tube B (Provetta *IGK* B) serve per identificare i riarrangiamenti dell'elemento di delezione kappa (K_{de}) con la regione variabile (V) e la regione intragenica $J\kappa-C\kappa$. I riarrangiamenti $V\kappa-K_{de}$ e introne $J\kappa-C\kappa-K_{de}$ che ne derivano sono il risultato di riarrangiamenti non riusciti che permangono nei linfociti B. Infine, la master mix Specimen Control Size Ladder (Marcatore di dimensione per il controllo del campione) identifica vari geni e genera una serie di ampliconi di 96, 197, 297, 397 e 602 nucleotidi (nt) per garantire che la qualità e la quantità di DNA iniziale sia adeguata per produrre un risultato valido. Un singolo programma del termociclatore e metodiche di indagine simili vengono utilizzati con tutti i nostri saggi di clonalità genica. Ciò migliora la coerenza e facilita l'utilizzo combinato di una vasta gamma di saggi differenti.

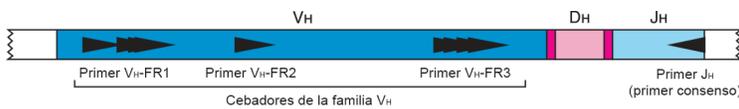
Questo saggio è basato sull'azione concertata BMH4-CT98-3936 di EuroClonality/BIOMED-2.



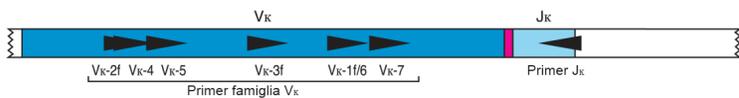
3. Principi della procedura

3.1. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

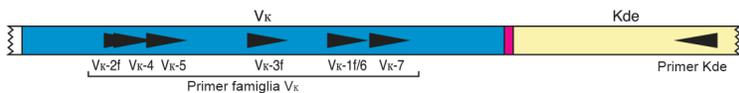
I saggi PCR sono utilizzati abitualmente per l'identificazione di popolazioni clonali di linfociti B. Questi test amplificano il DNA tra i primer che identificano le regioni conservate framework (FR) e di giunzione (J) (*IGH* Tubes A-C (Provette IGH A-C)), le regioni variabile (V) e di giunzione (J) (*IGK* Tube A (Provetta IGK A)) e le regioni variabile, introne J κ -C κ e K κ de (*IGK* Tube B (Provetta IGK B)). Queste regioni conservate si trovano su entrambi i lati di un'area all'interno della regione V-J in cui si verificano riarrangiamenti genici programmati durante la maturazione di tutti i linfociti B e T. I geni dei recettori antigenici che subiscono il riarrangiamento sono i geni che codificano per la catena pesante e la catena leggera delle cellule B, e i geni del recettore dei linfociti T nelle cellule T. Ciascun linfocita B e T ha un singolo riarrangiamento V-J produttivo che è unico sia in lunghezza che in sequenza. Pertanto, quando il DNA proveniente da una popolazione normale o policlonale è amplificato usando i primer di DNA che fiancheggiano la regione V-J, si genera una curva a campana (distribuzione gaussiana) di ampliconi all'interno di un intervallo di dimensioni atteso, che riflette la popolazione eterogenea dei riarrangiamenti V-J. Per il DNA proveniente da campioni contenenti una popolazione clonale, il risultato è costituito da uno o due prodotti amplificati prominenti (ampliconi) in un background policlonale ridotto.



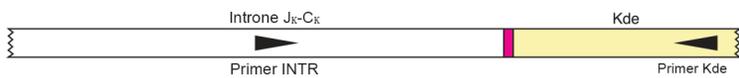
IGH Tube A (Provetta IGH A): 6 primer VH-FR1 + primer consenso JH
IGH Tube B (Provetta IGH B): 7 primer VH-FR2 + primer consenso JH
IGH Tube C (Provetta IGH C): 7 primer VH-FR3 + primer consenso JH



IGK tube A (Provetta IGH A): 6 primer V κ - 2 primer J κ



IGK tube B (Provetta IGH B): 6 primer V κ e primer INTR + 1 primer Kde



Poiché i geni del recettore antigenico sono polimorfici (costituiti da una popolazione eterogenea di sequenze di DNA correlate), è difficile impiegare un unico set di sequenze dei primer DNA per identificare tutte le regioni conservate che fiancheggiano il riarrangiamento V-J. La diversità della regione N e le mutazioni somatiche aumentano ulteriormente l'eterogeneità delle sequenze di DNA in queste regioni. Pertanto sono richieste master mix multiplex, per diverse regioni FR target, per identificare la maggior parte dei riarrangiamenti clonali. Come indicato, i riarrangiamenti clonali sono identificati come prodotti prominenti e di una sola dimensione, in un background di ampliconi di varie dimensioni che formano una distribuzione gaussiana intorno a un riarrangiamento statisticamente favorito. I primer che amplificano le diverse regioni FR, che si trovano in tre distinte sezioni lungo il gene della catena pesante, generano corrispondenti prodotti V-J di dimensioni differenti. Per i riarrangiamenti del gene *IGK*, la lunghezza della regione CDR3 è limitata e mostra una distorsione significativa (platicurtosi). Pertanto, i prodotti PCR mostrano una distribuzione gaussiana molto stretta e si identificano più facilmente e in maniera più affidabile con l'analisi eteroduplex.

Figura 1. È raffigurata una rappresentazione semplificata dell'organizzazione di un gene della catena pesante delle immunoglobuline (*IGH*) riarrangiato sul cromosoma 14 e di un gene della catena leggera kappa delle immunoglobuline sul cromosoma 2p11.2. Le frecce nere rappresentano le posizioni relative dei primer che hanno come bersaglio la regione conservata target framework (FR1-3) e i segmenti del gene J κ consenso a valle per *IGH* e dei primer per V κ , J κ , INTR e K κ de inclusi nelle provette master mix *IGK*. I prodotti di ampliconi generati da ciascuna di queste regioni possono essere rilevati differenzialmente, quando si usano impostazioni di primer fluorescenti con strumenti di elettroforesi capillare che impiegano il rilevamento di fluorescenza differenziale.

3.2. Rilevamento di fluorescenza differenziale

Il rilevamento di fluorescenza differenziale viene comunemente adoperato per identificare ampliconi di dimensioni diverse utilizzando uno strumento per elettroforesi capillare. I primer possono essere coniugati con svariati coloranti fluorescenti (fluorofori) in modo da produrre spettri di emissione diversi dopo eccitazione da parte di un laser nello

strumento per elettroforesi capillare. In questo modo, a diversi coloranti fluorescenti possono corrispondere differenti regioni target. Questo sistema di rilevamento offre sensibilità ineguagliabile, risoluzione fino al singolo nucleotide, rilevamento differenziale dei prodotti e quantificazione relativa. Inoltre, si può eliminare del tutto l'uso di gel di agarosio e poliacrilammide, così come l'uso di sostanze cancerogene come il bromuro di etidio. Inoltre, la rilevazione differenziale permette un'interpretazione accurata, riproducibile e oggettiva di prodotti primer-specifici e l'archiviazione automatica dei dati. La riproducibilità a livello di determinazione delle dimensioni nella stessa analisi e tra analisi diverse mediante elettroforesi capillare è di circa 1 o 2 nucleotidi. Queste riproducibilità e sensibilità, combinate con l'archiviazione automatica dei dati dei campioni, permettono il monitoraggio, la tracciatura e il confronto dei dati dei singoli pazienti nel tempo.

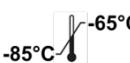
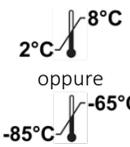
4. Reagenti

4.1. Componenti del reagente

Tabella 1: Saggi disponibili

Numero di catalogo	Descrizione	Quantità
REF 91000031	IdentiClone <i>IGH + IGK</i> B-Cell Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 reazioni
REF 91000041	IdentiClone <i>IGH + IGK</i> B-Cell Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 reazioni

Tabella 2. Componenti del kit

Reagente	N. di catalogo	Componenti del reagente (principi attivi)	Quantità unitaria	91000031 N. di unità	91000041 N. di unità	Temp. di conservazione
Master Mix	21010011CE	<i>IGH</i>Tube A – 6FAM (Provetta <i>IGH</i> A – 6FAM) Oligonucleotidi multipli per la regione target framework 1 del gene codificante per la catena pesante delle immunoglobuline in tampone salino.	1500 µL	1	10	
	21010101CE	<i>IGH</i>Tube B – 6FAM (Provetta <i>IGH</i> B – 6FAM) Oligonucleotidi multipli per la regione target framework 2 del gene codificante per la catena pesante delle immunoglobuline in tampone salino.	1500 µL	1	10	
	21010031CE	<i>IGH</i>Tube C – HEX (Provetta <i>IGH</i> C – HEX) Oligonucleotidi multipli per la regione target framework 3 del gene codificante per la catena pesante delle immunoglobuline in tampone salino.	1500 µL	1	10	
	21020011CE	<i>IGK</i>Tube A - 6FAM (Provetta <i>IGK</i> A – 6FAM) Oligonucleotidi multipli per le regioni variabile e di giunzione del gene codificante per la catena leggera kappa delle immunoglobuline in tampone salino.	1500 µL	1	10	
	21020021CE	<i>IGK</i>Tube B - 6FAM (Provetta <i>IGK</i> B – 6FAM) Oligonucleotidi multipli per le regioni variabile, introne Jκ-Cκ e K _{de} del gene codificante per la catena leggera kappa delle immunoglobuline in tampone salino.	1500 µL	1	10	
Master mix di controllo amplificazione template	20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM (Marcatore di dimensione per il controllo del campione - 6FAM) Oligonucleotidi multipli per geni housekeeping target.	1500 µL	1	10	
DNA di controllo positivo	40881750	IVS-0030 Clonal Control DNA (DNA di controllo clonale IVS-0030) 200 µg/mL di DNA in soluzione TE 1/10	100 µL	1	5	
	40881090	IVS-0019 Clonal Control DNA (DNA di controllo clonale IVS-0019) 200 µg/mL di DNA in soluzione TE 1/10	100 µL	1	5	
	40880370	IVS-0007 Clonal Control DNA (DNA di controllo clonale IVS-0007) 200 µg/mL di DNA in soluzione TE 1/10	100 µL	1	5	
DNA di controllo negativo (normale)	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (DNA di controllo policlonale IVS-0000) 200 µg/mL di DNA in soluzione TE 1/10	100 µL	1	5	

Nota: per la produzione di questo kit non sono stati utilizzati conservanti.

4.2. Avvertenze e precauzioni

- **IVD** Questo prodotto è per uso diagnostico *in vitro*.
- Utilizzare il kit del saggio come un sistema. Non utilizzare reagenti di altri produttori. La diluizione, la riduzione dei volumi 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 questo kit di analisi.
- 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. Fare attenzione a utilizzare i programmi del termociclatore corretti, poiché altri programmi potrebbero fornire dati imprecisi/errati, come risultati falsi positivi e falsi negativi.
- Non miscelare o combinare reagenti provenienti da kit con numeri di lotto diversi.
- Indossare adeguati dispositivi di protezione individuale e seguire le buone pratiche di laboratorio e le precauzioni universali quando si lavora con i campioni. I campioni devono essere maneggiati in strutture di contenimento per la sicurezza biologica approvate e aperti solo in cappe di biosicurezza certificate. Per la preparazione del DNA del campione utilizzare solamente acqua per biologia molecolare.
- A causa della sensibilità analitica di questo test, è necessario prestare estrema attenzione per evitare la contaminazione dei reagenti o delle miscele di amplificazione con campioni, controlli o materiali amplificati. Tutti i reagenti devono essere attentamente monitorati per la presenza di segni di contaminazione (*ad es.* controlli negativi che danno segnali positivi). Smaltire 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 eseguire la PCR.
- La sterilizzazione in autoclave non elimina la contaminazione del DNA. Il flusso di lavoro nel laboratorio di PCR deve essere unidirezionale: iniziare con la preparazione della master mix, passare alla preparazione del campione, quindi all'amplificazione e infine al rilevamento. Non portare il DNA amplificato nelle aree destinate alla preparazione della master mix o dei campioni.
- Tutte le pipette, i puntali delle pipette e qualsiasi apparecchiatura utilizzata in una determinata area devono essere dedicati a quella zona del laboratorio.
- Quando possibile, utilizzare materiale da laboratorio in plastica sterile monouso per evitare la contaminazione con RNasi e DNasi o la contaminazione crociata.

4.3. Conservazione e manipolazione

Se non utilizzati immediatamente, i kit devono essere **conservati a una temperatura compresa tra -85°C e -65°C**.

- La temperatura di conservazione ottimale per i controlli di DNA è compresa tra 2°C e 8°C, ma per la conservazione a lungo termine l'intervallo di temperatura indicato è compreso tra -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 risospesi completamente. L'agitazione eccessiva al vortex può danneggiare il DNA e causare il distacco dei fluorofori dai primer marcati.
- 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.
- A causa delle elevate concentrazioni di sali, le master mix per PCR sono sensibili ai cicli di congelamento/scongelamento. Aliquotare le master mix in provette sterili con tappo a vite e relativa guarnizione, se necessario.

5. Strumenti

5.1. Termociclatore

- Uso o funzione: amplificazione dei campioni di DNA
- Strumento consigliato: termociclatore Veriti™ o equivalente
- Caratteristiche prestazionali e specifiche:
 - intervallo termico minimo: da 15°C a 96°C
 - velocità di rampa minima: 0,8°C/s
- Seguire le procedure di installazione, utilizzo, calibrazione e manutenzione del produttore.
- Vedere la sezione 7.4 *Amplificazione* per il programma del termociclatore.

5.2. Strumenti per elettroforesi capillare ABI

- Uso o funzione: rilevamento e analisi dei frammenti
- Caratteristiche prestazionali e specifiche:
 - I seguenti strumenti di elettroforesi capillare soddisfano le esigenze di rendimento di quest'analisi:
 - ABI 310 Genetic Analyzer (1-capillary) (Analizzatore genetico ABI 310, 1 capillare)
 - ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (4-capillaries) (Analizzatore genetico ABI 3100 Avant, 4 capillari)
 - ABI 3100 Genetic Analyzer (16-capillaries) (Analizzatore genetico ABI 3100, 16 capillari)
 - ABI 3130 Genetic Analyzer (4-capillaries) (Analizzatore genetico ABI 3130, 4 capillari)
 - ABI 3130xL Genetic Analyzer (16-capillaries) (Analizzatore genetico ABI 3130xL, 16 capillari)
 - ABI 3500 Genetic Analyzer (8-capillaries) (Analizzatore genetico ABI 3500, 8 capillari)
 - ABI 3500xL Genetic Analyzer (24-capillaries) (Analizzatore genetico ABI 3500xL, 24 capillari)
- Seguire le procedure di installazione, utilizzo, calibrazione e manutenzione del produttore.
- Lo strumento ABI utilizzato deve essere calibrato con i riferimenti per la matrice appropriati, come indicato nella sezione 7.2 *Materiali necessari (non forniti)*.
- Utilizzare le impostazioni predefinite per il polimero e il tipo capillare.
- Consultare la sezione 7.5 *Rilevamento della fluorescenza ABI* per la preparazione del campione.

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 OSHA riferibili ai patogeni a trasmissione ematica o al livello di biosicurezza 2.

6.2. Sostanze interferenti

È noto che le seguenti sostanze interferiscono con la PCR:

- chelanti cationi divalenti
- puntali per pipetta a bassa ritenzione
- EDTA (non significativo a basse concentrazioni)
- eparina

6.3. Requisiti e manipolazione dei campioni

Questo test analizza il **DNA genomico** proveniente dalle seguenti fonti:

- 5 cc di sangue periferico, biopsia del midollo osseo o aspirato midollare anticoagulato con eparina o EDTA (conservato tra 2°C e 8°C e spedito a temperatura ambiente)
- un minimo di 5 mm cubici di tessuto (conservato e spedito congelato o conservato e spedito in RPMI 1640 a temperatura ambiente o con ghiaccio)
- 3 µg di DNA genomico (conservato tra 2°C e 8°C e spedito a temperatura ambiente)
- tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina o vetrini (conservati e spediti a temperatura ambiente)

6.4. Preparazione dei campioni

Estrarre il DNA genomico dai campioni provenienti dal paziente appena possibile. Risospendere il DNA a una concentrazione finale da 100 µg a 400 µg per mL in TE 1/10 (1 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) oppure in acqua per biologia molecolare o per uso farmaceutico. Questo è un sistema affidabile. Con una vasta gamma di concentrazioni di DNA si ottiene un risultato valido. Pertanto, di solito non è necessario quantificare e regolare le concentrazioni di DNA. L'analisi di un campione di DNA con la master mix Specimen Control Size Ladder (Marcatore di dimensione per il controllo del campione) serve a garantire la presenza di DNA di qualità e quantità sufficiente per produrre un risultato valido.

6.5. Conservazione dei campioni

Il DNA genomico deve essere conservato a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C o a una temperatura compresa tra -85°C e -65°C fino al momento dell'utilizzo.

7. Procedura del saggio

7.1. Materiali forniti

Tabella 3. Componenti del kit

N. di catalogo	Descrizione
21010011CE	<i>IGH</i> Tube A – 6FAM (Provetta <i>IGH</i> A – 6FAM)
21010101CE	<i>IGH</i> Tube B – 6FAM (Provetta <i>IGH</i> B – 6FAM)
21010031CE	<i>IGH</i> Tube C – HEX (Provetta <i>IGH</i> C – HEX)
21020011CE	<i>IGK</i> Tube A - 6FAM (Provetta <i>IGK</i> A – 6FAM)
21020021CE	<i>IGK</i> Tube B – 6FAM (Provetta <i>IGK</i> B – 6FAM)
20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM (Marcatore di dimensione per il controllo del campione - 6FAM)
40881750	IVS-0030 Clonal Control DNA (DNA di controllo clonale IVS-0030)
40881090	IVS-0019 Clonal Control DNA (DNA di controllo clonale IVS-0019)
40880370	IVS-0007 Clonal Control DNA (DNA di controllo clonale IVS-0007)
40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (DNA di controllo policlonale IVS-0000)

7.2. Materiali necessari (non forniti)

Tabella 4. Materiali necessari (non forniti)

Reagente/Materiale	Reagenti/Materiali consigliati e produttori	N. di catalogo	Note
DNA polimerasi	Roche: <ul style="list-style-type: none"> EagleTaq DNA Polymerase (DNA polimerasi EagleTaq) 	05206944190	N/D
	Invivoscribe, Inc.: <ul style="list-style-type: none"> FalconTaq DNA Polymerase (DNA polimerasi FalconTaq) o equivalente 	60970130	
Acqua distillata in vetro, deionizzata, per biologia molecolare o acqua purificata per uso farmaceutico	N/D	N/D	Sterile e priva di DNasi e RNasi.
Pipette calibrate	Rainin: <ul style="list-style-type: none"> pipette P-2, P-20, P-200 e P-1000 o pipette SL-2, SL-20, SL-200 e SL-1000 	N/D	Devono essere in grado di misurare con precisione volumi compresi tra 1 µL e 1000 µL.
Termociclatore	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Veriti Dx Thermal Cycler Bio-Rad: <ul style="list-style-type: none"> PTC-100 o PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer <ul style="list-style-type: none"> PE 9600 o PE 9700 	N/D	N/D
Agitatore vortex	N/D	N/D	N/D
Piastre o provette per PCR	N/D	N/D	Sterili
Puntali per pipetta con filtro	N/D	N/D	Privi di pirogeni/RNasi/DNasi, sterili
Provette per microcentrifuga	N/D	N/D	Sterili
Strumenti per elettroforesi capillare ABI	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> ABI 310, 3100 o 3500 series (Serie ABI 310, 3100 o 3500) 	N/D	N/D
Formammide Hi-Di	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> Hi-Di™ Formamide (Formammide Hi-Di™) 	4311320	N/D
Standard di riferimento	Invivoscribe: <ul style="list-style-type: none"> Hi-Di Formamide (Formammide Hi-Di) con standard di riferimento ROX per ABI 3100 	60980061	N/D
	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> Per strumenti ABI 3100 o 3130: <ul style="list-style-type: none"> GeneScan™ - 400HD [ROX]™ 	402985	
	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> Per strumenti ABI 3500: <ul style="list-style-type: none"> GeneScan - 600 [LIZ]™ v2.0 	4408399	

Tabella 4. Materiali necessari (non forniti)

Reagente/Materiale	Reagenti/Materiali consigliati e produttori	N. di catalogo	Note
Set di coloranti per calibrazione spettrale	Applied Biosystems:		
	<ul style="list-style-type: none"> • Per strumenti ABI 3100 e 3130: <ul style="list-style-type: none"> ○ DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D) (Kit con riferimenti per la matrice DS-30 (Set di coloranti D)) 	4345827	N/D
	<ul style="list-style-type: none"> • Per strumenti ABI 310: <ul style="list-style-type: none"> ○ Matrix Standard NED (Riferimento per la matrice NED) ○ e Fluorescent Amidite Matrix Standards [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX] (Riferimenti per la matrice Fluorescent Amidite [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX]) 	402996	
	<ul style="list-style-type: none"> • Per strumenti ABI 3500: <ul style="list-style-type: none"> ○ DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5) (Kit con riferimenti per la matrice DS-33 (Set di coloranti G5)) 	401546	
	4345833		
Polimero	Applied Biosystems:		
	<ul style="list-style-type: none"> • POP-4™ Polymer (Polimero POP-4™): <ul style="list-style-type: none"> ○ POP-4 per 310 Genetic Analyzers (Analizzatori genetici 310) 	402838	N/D
	<ul style="list-style-type: none"> ○ POP-4 per 3100/3100-Avant Genetic Analyzers (Analizzatori genetici 3100/3100 Avant) 	4316355	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ POP-4 per 3130/3130xL Genetic Analyzers (Analizzatori genetici 3130/3130xL) 	4352755	
	<ul style="list-style-type: none"> • POP-7™ Polymer (Polimero POP-7™): <ul style="list-style-type: none"> ○ POP-7 per 3130/3130xL Genetic Analyzers (Analizzatori genetici 3130/3130xL) 	4352759	
<ul style="list-style-type: none"> ○ POP-7 per 3500/3500xL Genetic Analyzers (Analizzatori genetici 3500/3500xL) 	4393714		
Tampone	Applied Biosystems:		
	<ul style="list-style-type: none"> • Genetic Analyzer Buffer (Tampone per analizzatore genetico) con EDTA 10X 	402824	Diluire 1:10 in acqua sterile prima dell'uso

7.3. Preparazione dei reagenti

- Tutti i campioni sconosciuti possono essere analizzati utilizzando la master mix Specimen Control Size Ladder per garantire che non sia presente alcun inibitore dell'amplificazione e che il DNA sia di qualità e quantità sufficienti per produrre un risultato valido.
- I risultati di un unico test sono validi; tuttavia, si raccomanda di eseguire l'analisi in **duplicato** quando possibile. Se i risultati dei duplicati non sono coerenti, è necessario ripetere il test o l'analisi del campione.
- I controlli **positivi**, **negativi** e **senza template** devono essere analizzati per ciascuna master mix.
- È consigliato massimizzare il numero di campioni all'interno della stessa corsa in modo tale da evitare l'esaurimento del controllo negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA). Se ciò non fosse possibile a causa dell'organizzazione interna del laboratorio, si può ordinare separatamente il IVS-0000 Polyclonal Control DNA.

7.3.1. Indossare dei guanti e rimuovere le master mix dal congelatore. Lasciare scongelare completamente le provette, quindi passarle delicatamente al vortex per mescolarle.

7.3.2. In una cappa di contenimento o in una cappa per PCR, rimuovere un'aliquota appropriata da ciascuna master mix e trasferirla in singole provette per microcentrifuga pulite e sterili.

- I volumi delle aliquote devono essere pari a **45 µL** per ciascuna reazione.
- Aggiungere un'ulteriore reazione ogni 15 reazioni per compensare errori di pipettamento.
- Pertanto, per ciascuna master mix (tranne per la Specimen Control Size Ladder), il numero di reazioni (**n**) è:

n = 2 × n. di campioni	(analizzare ciascun campione in duplicato)
+ 1	DNA di controllo positivo (consultare la sezione 7.7 <i>Controlli positivi raccomandati</i>)
+ 1	DNA di controllo negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	controllo senza template (acqua)
+ 1	per compensare errori di pipettamento
n = 2 × n. di campioni + 4	Totale

- Pertanto, il volume totale di aliquota per ogni master mix deve essere pari a **n × 45 µL**.

- Per la master mix Specimen Control Size Ladder (Marcatore di dimensione per il controllo del campione), il numero delle reazioni (**m**) è:

m = n. di campioni	(analizzare ciascun campione in duplicato)
+ 1	DNA di controllo positivo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	controllo senza template (acqua)
+ 1	per compensare errori di pipettaggio
m = n. di campioni + 3	Totale

- Pertanto, il volume totale di aliquota per la master mix Specimen Control Size Ladder è **m × 45 µL**.

7.3.3. Aggiungere 1,25 U (o 0,25 µL a 5 U/µL) di Taq DNA polymerase per reazione a ogni master mix.

- Il totale di DNA polimerasi Taq aggiunto a ciascuna master mix è **n × 0,25 µL** e **m × 0,25 µL** per la master mix Specimen Control Size Ladder.
- Mescolare delicatamente mediante vortex.

7.3.4. Per ogni reazione, aliquotare 45 µL della master mix appropriata + soluzione di DNA polimerasi in singoli pozzetti su una piastra per PCR o in una provetta.

7.3.5. Aggiungere 5 µL di template appropriato (DNA del campione, DNA di controllo positivo, DNA di controllo negativo o acqua) nei singoli pozzetti contenenti le rispettive soluzioni master mix.

- Pipettare diverse volte su e giù per mescolare.

7.3.6. Tappare o coprire la piastra per PCR.

- A questo punto, i campioni sono pronti per essere amplificati su un termociclatore.
- Se l'amplificazione non può essere eseguita immediatamente dopo la preparazione dei reagenti, la piastra o le provette per PCR possono essere conservate tra 2°C e 8°C fino a 24 ore.

Guida rapida:

Per ciascuna master mix e n reazioni, mescolare:

n × 45 µL Master Mix

n × 0,25 µL DNA polimerasi Taq

Mescolare delicatamente mediante vortex.

Aliquotare **45 µL** della soluzione di master mix e DNA polimerasi in ciascun pozzetto di reazione.

Aggiungere **5 µL** del template appropriato a ciascun pozzetto.

Volume reazione totale = **50 µL**

7.4. Amplificazione

7.4.1. Amplificare i campioni con il seguente programma PCR:

- Utilizzare l'opzione **calcolato** per la misura di temperatura con i termociclatori BioRad MJ Research PTC.

Tabella 5: Condizioni per i cicli termici

Fase	Temperatura	Durata	Cicli
1	95°C	7 minuti	1
2	95°C	45 secondi	35
3	60°C	45 secondi	
4	72°C	90 secondi	
5	72°C	10 minuti	1
6	15°C	∞	1

7.4.2. Rimuovere la piastra o le provette di amplificazione dal termociclatore.

- Sebbene il DNA amplificato sia stabile a temperatura ambiente per lunghi periodi di tempo, i prodotti di PCR devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C fino al momento del rilevamento. Il rilevamento deve avvenire entro 30 giorni dall'amplificazione.

7.5. Rilevamento della fluorescenza ABI

Tenere presente che per il rilevamento della fluorescenza ABI si osserva spesso un picco precedente che è un artefatto dovuto al metodo di rilevamento legato all'uso delle piattaforme ABI. I picchi precedenti sono talvolta distorti e hanno basi in pendenza sul lato destro verso il picco vero e proprio. Ciò è particolarmente evidente nella master mix Specimen Control Size Ladder (Marcatore di dimensione per il controllo del campione), in cui il picco corrispondente ai 96 nucleotidi è preceduto da un picco che si manifesta a 84 nucleotidi.

- Il multiplexing di prodotti di PCR con master mix diverse causerà una riduzione della sensibilità complessiva del saggio.

Piattaforme ABI 310, 3100 o 3130

- 7.5.1. In una nuova provetta per microcentrifuga, miscelare una quantità adeguata (un totale di 10 µL per reazione) di formammide Hi-Di con standard di riferimento ROX. Mescolare accuratamente mediante vortex.
- 7.5.2. In una nuova piastra per PCR da 96 pozzetti, aggiungere 10 µL di Formammide Hi-Di con standard di riferimento ROX in singoli pozzetti per ciascuna reazione.
- 7.5.3. Trasferire 1 µL di ciascuna reazione nei pozzetti contenenti Formammide Hi-Di con standard di riferimento ROX.
 - Aggiungere un solo campione per pozzetto.
 - Pipettare su e giù per mescolare.
- 7.5.4. Tappare o coprire la piastra o le provette per PCR.
- 7.5.5. Denaturare termicamente i campioni a 95 °C per 2 minuti, quindi abbassare rapidamente la temperatura su ghiaccio per 5 minuti.
- 7.5.6. Preparare una scheda per il campione e un elenco delle iniezioni per i campioni.
- 7.5.7. Analizzare i campioni con uno strumento per elettroforesi capillare ABI secondo le istruzioni del manuale d'uso.
 - I dati vengono visualizzati automaticamente come picchi di dimensione e colore specifici.
- 7.5.8. Esaminare il profilo e i controlli, e riportare i risultati. (Vedere le sezioni 8: *Interpretazione dei risultati* e 10: *Valori attesi*, in basso.)

Piattaforme ABI 3500:

Nota: a causa delle variazioni nelle prestazioni tra i diversi strumenti della piattaforma ABI 3500, la quantità di formammide, di campione e standard di riferimento elencati nel protocollo è da intendersi come punto di partenza. Il protocollo può avere bisogno di essere ottimizzato per le specifiche piattaforme ABI 3500.

- 7.5.9. In una nuova provetta per microcentrifuga, miscelare una quantità adeguata (9,5 µL per PCR) di Formammide Hi-Di con standard di riferimento LIZ. Mescolare accuratamente mediante vortex.
- 7.5.10. In una nuova piastra per PCR da 96 pozzetti, aggiungere 9,5 µL di Formammide Hi-Di con standard di riferimento LIZ in singoli pozzetti per ciascuna PCR.
- 7.5.11. Trasferire 0,5 µL di ciascuna PCR nei pozzetti contenenti Formammide Hi-Di con standard di riferimento LIZ.
 - Aggiungere un solo campione per pozzetto.
 - Pipettare su e giù per mescolare.
- 7.5.12. Tappare o coprire la piastra per PCR.
- 7.5.13. Denaturare termicamente i campioni a 95°C per 3 minuti, quindi abbassare rapidamente la temperatura trasferendoli direttamente su ghiaccio per 5 minuti.
- 7.5.14. Preparare una scheda per il campione e un elenco delle iniezioni per i campioni.
- 7.5.15. Analizzare i campioni con uno strumento per elettroforesi capillare ABI 3500 secondo le istruzioni del relativo manuale.
 - I dati vengono visualizzati automaticamente come picchi di dimensione e colore specifici.
- 7.5.16. Esaminare il profilo e i controlli, e riportare i risultati. (Vedere le sezioni 8: *Interpretazione dei risultati* e 10: *Valori attesi*, in basso.)

7.6. Controllo di qualità

Con il kit sono forniti controlli positivi e negativi (o normali), che devono essere analizzati in singolo ogni volta che si effettua il saggio per garantire che sia stato eseguito correttamente. Inoltre, occorre includere un controllo senza template (*ad es.* acqua) per verificare l'eventuale contaminazione della master mix o la contaminazione crociata delle PCR, dovuta all'impiego di una tecnica sterile impropria. È possibile anche aggiungere un controllo tampone per assicurare che non si sia verificata alcuna contaminazione del tampone utilizzato per risospendere i campioni. I valori dei controlli positivi sono riportati nella sezione *10.1 Dimensione attesa dei prodotti amplificati*. Invivoscribe offre controlli aggiuntivi e controlli di sensibilità (diluizioni di controlli positivi in un controllo negativo).

7.7. Controlli positivi raccomandati

Le dimensioni degli ampliconi indicate sono state determinate utilizzando una piattaforma ABI. Le dimensioni degli ampliconi osservate sullo strumento per elettroforesi capillare specifico possono differire di 1-4 nucleotidi (nt) rispetto a quelle elencate, a seconda della piattaforma di rilevamento e della versione del software di analisi utilizzati. Una volta identificata, la dimensione degli ampliconi determinata sulla piattaforma specifica sarà coerente tra i vari test. Questa riproducibilità è estremamente utile nel monitoraggio della ricorrenza della malattia.

Nota: "Colore" indica il colore dei prodotti generati con la master mix quando si utilizza l'assegnazione dei colori predefinita sui sistemi di rilevamento della fluorescenza ABI.

Tabella 6. Dimensioni attese dei controlli positivi raccomandati

Master mix	Bersaglio	Colore	DNA di controllo	N. di catalogo	Dimensioni del prodotto in nucleotidi (nt)
<i>IGH</i> Tube A	FR1-J _H	Blu	Range di dimensioni valido IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 40881750	310 - 360 280 ^a , 325
<i>IGH</i> Tube B	FR2-J _H	Blu	Range di dimensioni valido IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 40881750	250 - 295 260
<i>IGH</i> Tube C	FR3-J _H	Verde	Range di dimensioni valido (IVS-0019 Clonal Control DNA)	--- 40881090	100 - 170 145
<i>IGK</i> Tube A	V _K -J _K	Blu	Range di dimensioni valido IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40880370	120 - 160, 190 - 210, 260 - 300 143
<i>IGK</i> Tube B	V _K -K _{de} + introne-K _{de}	Blu	Range di dimensioni valido IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40880370	210 - 250, 270 - 300, 350 - 390 274, 282
Specimen Control Size Ladder	Geni multipli	Blu	Range di dimensioni valido IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	96, 197, 297, 397, 602^b 96, 197, 297, 397, 602 ^b

^aNota: può anche essere presente una banda di 280 nt e si tratta di un amplicone conosciuto che si trova appena al di fuori del range di dimensioni valide per *IGH* Tube A.

^bNota: dal momento che sono amplificati preferibilmente frammenti di PCR di dimensioni inferiori, non è insolito avere il frammento di 602 nt con segnale ridotto o completamente assente.

8. Interpretazione dei risultati

Anche se i risultati positivi sono altamente indicativi di processo neoplastico, occorre interpretare sia i risultati positivi che quelli negativi nel contesto di tutte le informazioni cliniche e dei risultati delle analisi di laboratorio. Il range di dimensioni per ogni master mix è stato determinato analizzando campioni di controllo positivi e negativi. Per un'interpretazione accurata e significativa è importante ignorare i picchi che si verificano al di fuori del range di dimensioni valide per ciascuna master mix.

8.1. Analisi

- 8.1.1. I campioni per i quali non si riesce a ottenere un'amplificazione a seguito di ripetute prove devono essere refertati come segue: **"Non è possibile riportare un risultato per questo campione in quanto il DNA era di qualità o quantità insufficienti per l'analisi"**.
- 8.1.2. Ripetere l'analisi dei campioni con risultati negativi, se la reazione positiva del controllo non va a buon fine.
- 8.1.3. Se i campioni analizzati in duplicato danno risultati divergenti, è necessario ripetere nuovamente il test e/o l'analisi dei campioni per escludere uno scambio dei campioni.
- 8.1.4. Esaminare tutti i controlli del saggio prima di procedere all'interpretazione dei risultati dei campioni. Se i controlli non producono i risultati corretti, il saggio non è valido e i campioni non possono essere interpretati.

Tabella 7. Di seguito sono descritte le analisi di ciascun controllo e le decisioni da prendere sulla base dei risultati ottenuti.

Tipo di controllo	Risultato atteso	Risultato erraneo
Controllo senza template	Nessuna amplificazione presente, continuare con l'analisi.	Amplificazione presente, ripetere il saggio.
Controllo policlonale	Le dimensioni del prodotto sono coerenti con le dimensioni previste, elencate nella sezione 10.1 <i>Dimensione attesa dei prodotti amplificati</i> . Nessun riarrangiamento clonale presente. Continuare con l'analisi.	Riarrangiamenti clonali presenti. Ripetere il saggio
Controllo positivo (Può essere anche un controllo di estrazione, se il materiale per il controllo positivo viene prelevato attraverso processi di estrazione)	Le dimensioni del prodotto sono coerenti con le dimensioni previste, elencate nella sezione 10.1 <i>Dimensione attesa dei prodotti amplificati</i> . Continuare con l'analisi.	Ripetere il saggio.
Specimen Control Size Ladder (Marcatore di dimensione per il controllo del campione) (Questo controllo di amplificazione è <u>essenziale</u> per i campioni di quantità e qualità sconosciute.)	Se sono visibili tutti i picchi di 96, 197, 297, 397, e 602 nt, continuare con l'analisi. Dal momento che vengono preferenzialmente amplificati frammenti di PCR di dimensioni inferiori, non è inconsueto che il frammento di 602 nt presenti un segnale ridotto o che sia del tutto assente. Continuare con l'analisi.	Se non ci sono bande visibili, ripetere il saggio <u>a meno che il campione non risulti positivo</u> . Se sono visibili solo 1, 2, o 3 bande, rivalutare il campione per verificare l'eventuale degradazione del DNA, <u>a meno che il campione non risulti positivo</u> .

8.2. Interpretazione del campione

Presupponendo che i controlli producano i risultati attesi, i campioni clinici devono essere interpretati come segue:

- Una o due bande positive prominenti^a all'interno del range di dimensioni valide vanno riportati come: **"Positivo per il rilevamento di riarrangiamento/i clonale/i dei geni codificanti per la catena leggera kappa o per la catena pesante delle immunoglobuline, coerente con la presenza di una popolazione clonale di cellule. Nel contesto dei criteri diagnostici complessivi, le popolazioni clonali di cellule possono indicare la presenza di neoplasia ematologica."**
- L'assenza di bande positive^a all'interno del range di dimensioni valide va riportata come: **"Negativo per l'identificazione di riarrangiamento/i clonale/i dei geni codificanti per la catena leggera kappa o la catena pesante delle immunoglobuline."**

^aNota: i criteri per la definizione di una banda positiva sono i seguenti:

- I prodotti generati da campioni che rientrano nel range di dimensioni valide e sono almeno tre volte l'ampiezza del terzo picco maggiore nel background policlonale sono coerenti con un picco positivo.
- I prodotti generati da **campioni raccolti dopo la diagnosi iniziale** che rientrano nel range di dimensioni valide e;
 - 1) sono almeno tre volte l'ampiezza del terzo picco maggiore; oppure,
 - 2) superano l'ampiezza dei picchi limitrofi adiacenti e sono identici in dimensione ai prodotti clonali precedentemente generati dallo stesso paziente utilizzando la stessa master mix, sono coerenti con un picco positivo.

9. Limiti della procedura

- Questo saggio non permette di identificare il 100% delle popolazioni cellulari clonali.
- Questo saggio non è in grado di rilevare, in modo affidabile, meno di una (1) cellula positiva per 100 cellule normali.
- I risultati dei test molecolari di clonalità devono sempre essere interpretati nel contesto di dati clinici, istologici e immunofenotipici.
- I saggi basati su PCR sono soggetti a interferenze dovute alla degradazione del DNA o all'inibizione della PCR a causa della possibile presenza di EDTA, eparina e altri agenti.

10. Valori attesi

10.1. Dimensione attesa dei prodotti amplificati

Le dimensioni degli ampliconi indicate sono state determinate utilizzando una piattaforma ABI. Le dimensioni degli ampliconi osservate sullo strumento per elettroforesi capillare specifico possono differire di 1-4 nucleotidi (nt) rispetto a quelle elencate, a seconda della piattaforma di rilevamento e della versione del software di analisi utilizzati. Una volta identificata, la dimensione degli ampliconi determinata sulla piattaforma specifica sarà coerente tra i vari test. Questa riproducibilità è estremamente utile nel monitoraggio della ricorrenza della malattia.

Note: "Colore" indica il colore dei prodotti generati con la master mix quando si utilizza l'assegnazione dei colori predefinita sui sistemi di rilevamento della fluorescenza ABI.

Tabella 8. Dimensioni attese dei prodotti amplificati

Master mix	Bersaglio	Colore	DNA di controllo	N. di catalogo	Dimensioni del prodotto in nt
<i>IGH</i> Tube A	FR1-J _H	Blu	Range di dimensioni valido IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0030 Clonal Control DNA (IVS-0019 Clonal Control DNA)	--- 40920010 40881750 40881090	310 - 360 310 - 360 280 ^a , 325 345
<i>IGH</i> Tube B	FR2-J _H	Blu	Range di dimensioni valido IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0030 Clonal Control DNA (IVS-0019 Clonal Control DNA)	--- 40920010 40881750 40881090	250 – 295 250 - 295 260 285
<i>IGH</i> Tube C	FR3-J _H	Verde	Range di dimensioni valido IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0030 Clonal Control DNA IVS-0019 Clonal Control DNA	--- 40920010 40881750 40881090	100 - 170 100 - 170 --- 145
<i>IGK</i> Tube A	V _K -J _K	Blu	Range di dimensioni valido IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880370	120 - 160, 190 - 210, 260 - 300 135 - 155 143
<i>IGK</i> Tube B	V _K -K _{de} + introne-K _{de}	Blu	Range di dimensioni valido IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880370	210 - 250, 270 - 300, 350 - 390 225 - 245, 265 - 285, 404 ^{b,c} 274, 282
Specimen Control Size Ladder	Geni multipli	Blu	Range di dimensioni valido IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	96, 197, 297, 397, 602^d 96, 197, 297, 397, 602 ^d

^aNota: può anche essere presente una banda di 280 nt e si tratta di un amplicone conosciuto che si trova appena al di fuori del range di dimensioni valide per *IGH* Tube A (Provetta *IGH* A).

^bNota: la distribuzione normale dei riarrangiamenti genici *IGK* è altamente troncata a causa della limitata diversità giunzionale. Fare riferimento alla pubblicazione di Rock *et al.* per una spiegazione dettagliata.⁵

^cNota: in condizioni non ottimali, è possibile rilevare un prodotto di 404 nt non specifico nel Tube B (Provetta B). Per distinguere tra specifico e non specifico, il DNA di controllo negativo non deve mostrare questa banda all'interno dello stesso esperimento. Se è presente una banda, si considera pertanto non specifica.

^dNota: dal momento che sono amplificati preferibilmente frammenti di PCR di dimensioni inferiori, non è insolito avere il frammento di 602 nt con segnale ridotto o completamente assente.

10.2. Dati del campione

I dati mostrati in basso sono stati generati utilizzando le master mix indicate. L'analisi dei prodotti amplificati è stata effettuata su uno strumento ABI.

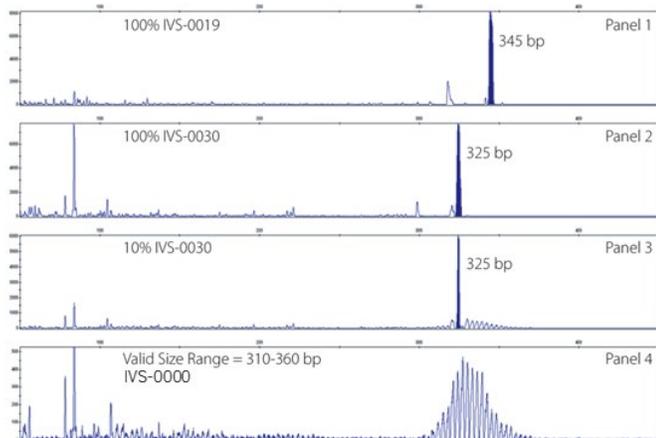


Figura 2. IGH Tube A (Provetta IGH A)

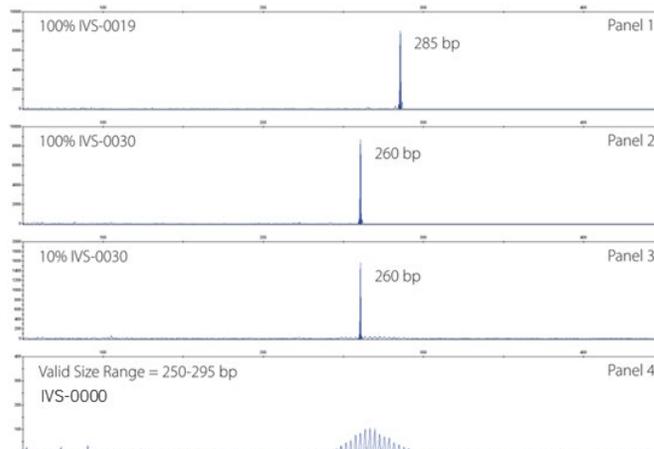


Figura 3. IGH Tube B (Provetta IGH B)

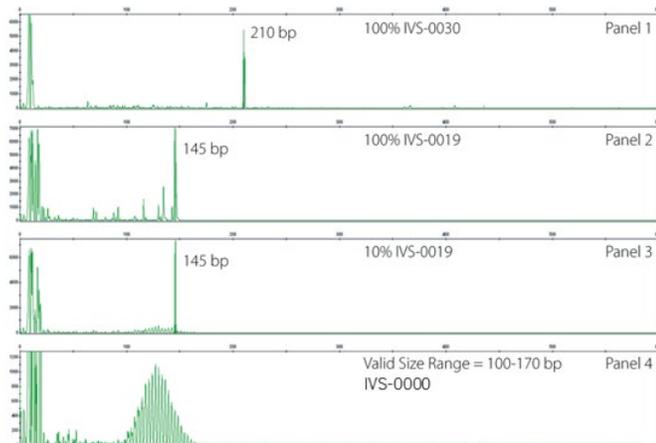


Figura 4. IGH Tube C (Provetta IGH C)

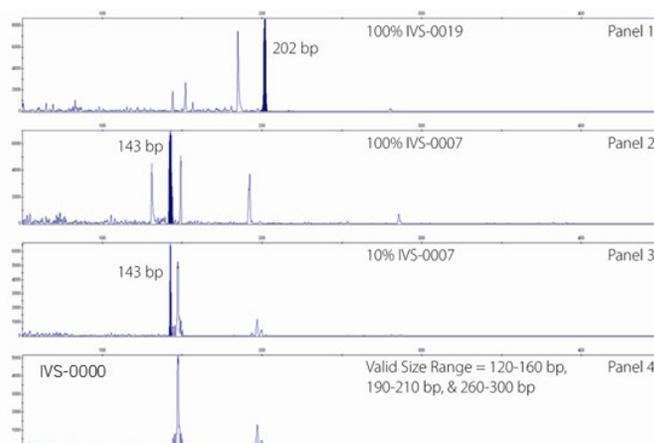


Figura 5. IGK Tube A (Provetta IGK A)

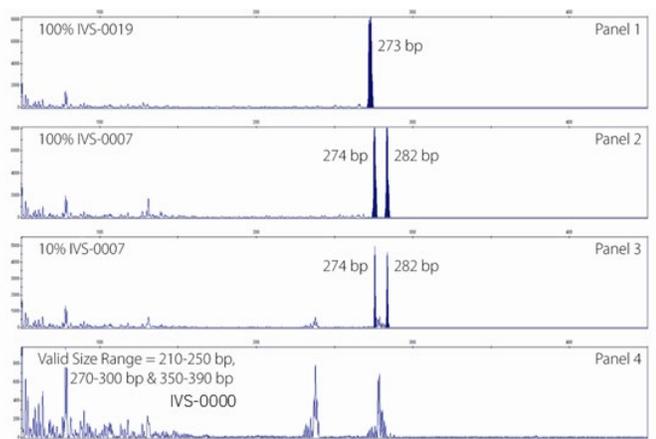


Figura 6. IGK Tube B

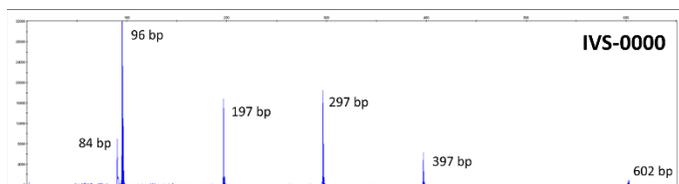


Figura 7. Per la master mix Specimen Control Size Ladder (Marcatore di dimensione per il controllo del campione)

11. Caratteristiche prestazionali

Il saggio IdentiClone *IGH + IGK* B-Cell Clonality PCR è una procedura rapida e affidabile che è molto più sensibile rispetto all'analisi Southern Blot (SB), nel rilevamento della clonalità in sospette linfoproliferazioni. La diagnosi clinico-istopatologica finale correla bene con i risultati della PCR in un numero maggiore di pazienti, rispetto ai risultati di SB.^{2,3}

Tabella 9. Studi sulla concordanza

Concordanza PCR/SB: ²		Concordanza PCR/SB: ³	
<i>IGH</i> :	93% sensibilità/ 92% specificità	<i>IGH + IGK</i> :	85% sensibilità
<i>IGK</i> :	90% sensibilità/ 90% specificità		
<i>IGL</i> :	86% sensibilità/ 92% specificità		
<i>TCRB</i> :	86% sensibilità/ 98% specificità	<i>TCRB</i> :	85% sensibilità
<i>TCRG</i> :	89% sensibilità/ 94% specificità		
<i>TCRD</i> :	83% sensibilità/ 95% specificità		

Tabella 10. Analisi PCR vs. SB relativa a istopatologia e diagnosi finale

	Concordanza PCR/SB:	Sensibilità PCR:	Sensibilità SB:
<i>IGH + IGK</i> :	85%	98%	39%
<i>TCRB</i> :	85%	96%	35%

Uno studio indipendente di Sandberg *et al.*, è stato condotto su 300 campioni di pazienti provenienti da vari tipi di campioni.³ Nei casi in cui sono state eseguite sia analisi PCR che SB e si sono potuti correlare i risultati con l'istopatologia e la diagnosi finale, l'accuratezza diagnostica dei saggi IdentiClone selezionati è risultata di almeno il 96%. Tale accuratezza è molto superiore ai test SB, che in questo studio non hanno identificato 23 chiari casi di neoplasia e sette casi di probabile neoplasia. Non si sono verificati falsi positivi generati utilizzando i test IdentiClone e c'è stato un alto livello di precisione.³ Inoltre, un chiaro vantaggio di questa analisi è stato che i risultati clonali generati hanno permesso il successivo rilevamento di riarrangiamenti genici specifici del paziente e del tumore, per un rilevamento della malattia residuale minimo.

12. Bibliografia

1. Miller, JE, Wilson, SS, Jaye, DJ, Kronenberg, M. (1999). An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Molecular Diagnostics* 4, 101-117.
2. Van Dongen, JJM *et al.* (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 17, 2257-2317.
3. Sandberg, Y, *et al.* (2005). BIOMED-2 multiplex immunoglobulin/T-cell receptor polymerase chain reaction protocols can reliably replace Southern Blot analysis in routine clonality diagnostics. *J. Molecular Diagnostic* 7, 495-503.
4. van Krieken, JHJM *et al.* (2007). Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: – Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 21, 201-206.
5. Rock, EP, Sibbald, PR, Davis, MM, Chein, YH. (1994). CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J. Exp. Med.*, 179, 323-328.

13. Assistenza tecnica e Servizio clienti

Il personale dell'Assistenza tecnica e del Servizio clienti è disponibile dal lunedì al venerdì e può essere contattato per telefono, e-mail o attraverso il sito web.

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

14. Simboli

Sulle etichette dei prodotti diagnostici Invivoscribe sono attualmente 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 in vitro
	Identificatore Dispositivo Univoco		Produttore
	Conformità Britannica Valutata		Persona responsabile nel Regno Unito
	Rappresentante Autorizzato per la Svizzera		Conformità Europea

15. Avviso legale

15.1. Garanzia e dichiarazione di responsabilità

Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) si impegna a fornire prodotti di alta qualità. Invivoscribe® garantisce che i prodotti soddisfino o superino gli standard di prestazione descritti nelle istruzioni per l'uso, per quanto riguarda i prodotti provvisti di tale documentazione. Se un prodotto è soggetto a specifici standard di funzionamento ma le sue prestazioni differiscono da quelle indicate, la nostra politica è quella di sostituire il prodotto o rimborsare l'intero prezzo di acquisto. Invivoscribe® non fornisce nessun altro tipo di garanzia, espressa o implicita. La responsabilità di Invivoscribe® non deve superare il prezzo di acquisto del prodotto. Invivoscribe declina ogni responsabilità per danni diretti, indiretti, consequenziali o incidentali derivanti dall'uso, dai risultati dell'uso o dall'incapacità di utilizzare i suoi prodotti; l'efficacia del prodotto deve essere determinata in condizioni controllate dall'acquirente nel laboratorio del medesimo e deve essere costantemente monitorata attraverso processi definiti e controllati dall'acquirente, inclusi, a titolo esemplificativo e non limitativo, la prova dei controlli positivi, negativi e in bianco ogni volta che viene analizzato un campione. Ordinando, accettando e usando il prodotto, l'acquirente acconsente ad essere l'unico responsabile e garante dell'efficacia del prodotto, accettando le limitazioni di responsabilità stabilite in questo paragrafo.

Questo è un prodotto per uso diagnostico *in vitro* non disponibile per la vendita o l'uso in Nordamerica.

15.2. Brevetti e marchi commerciali

Questo prodotto è coperto da uno o più dei seguenti brevetti: Numero di brevetto europeo 1549764, Numero di brevetto europeo 2418287, Numero di brevetto europeo 2460889, Numero di brevetto giapponese 4708029, Numero di brevetto degli Stati Uniti 8859748 e altre relative domande di brevetto depositate e future. Tutti questi brevetti e queste domande sono concesse in licenza esclusivamente a Invivoscribe®. Invivoscribe detiene ulteriori brevetti, che coprono alcuni di questi prodotti, validi in altri Paesi. Molti di questi prodotti possono richiedere l'uso di metodi di amplificazione degli acidi nucleici come la reazione a catena della polimerasi (PCR). L'acquisto di questo prodotto non concede all'acquirente alcuna licenza, espressa o implicita, ai sensi dei presenti brevetti all'uso di processi o di enzimi di amplificazione.

IdentiClone® è un marchio registrato di Invivoscribe®.

© 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.