IdentiClone®

Istruzioni per l'uso

IdentiClone® *IGK* Gene Clonality Assay

CE UK CA IVD

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

IVD Per uso diagnostico *in vitro*

invivoscribe®

Condizioni di conservazione: da -85°C a -65ºC
(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 91020021	IdentiClone *IGK* Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 reazioni
REF 91020031	IdentiClone *IGK* Gene 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 differenziale in fluorescenza 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 del campione 8
   6.5. Conservazione dei campioni 8
7. PROCEDURA DEL SAGGIO 8
   7.1. Materiali forniti 8
   7.2. Materiali necessari (non forniti) 9
   7.3. Preparazione dei reagenti 10
   7.4. Amplificazione 11
   7.5. Rilevamento della fluorescenza ABI 11
   7.6. Controllo di qualità 12
   7.7. Controlli positivi raccomandati 12
8. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI 13
   8.1. Analisi 13
   8.2. Interpretazione del campione 13
9. LIMITI DELLA PROCEDURA 14
10. VALORI ATTESI 14
   10.1. Dimensioni attese dei prodotti amplificati 14
   10.2. Dati del campione 14
11. CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI 15
12. BIBLIOGRAFIA 16
13. ASSISTENZA TECNICA E SERVIZIO CLIENTI 16
14. SIMBOLI 16
15. AVVISO LEGALE 17
   15.1. Garanzia e dichiarazione di responsabilità 17
   15.2. Brevetti e marchi commerciali 17

1. Destinazione d'uso

IdentiClone *IGK* Gene 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 leggera kappa delle immunoglobuline in pazienti con sospette linfoproliferazioni. In particolare, *IGK* Gene Clonality Assay può essere utilizzato per:

- identificare clonalità nei disturbi linfoproliferativi atipici
- supportare la diagnosi differenziale tra lesioni reattive e neoplasie ematologiche
- assegnare una linea cellulare presuntiva nei disordini linfoproliferativi monoclonali maturi
- identificare i marcatori tumorali specifici (riarrangiamenti genici di *IGK* e *IGK*-K_{de}) 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 impiegano primer multipli di DNA consenso che identificano regioni genetiche conservate target, all'interno del gene codificante la catena pesante delle immunoglobuline. Questo test viene utilizzato per rilevare la maggior parte delle neoplasie clonali delle cellule 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 condotte in oltre trenta centri di test indipendenti all'avanguardia in tutta Europa, in uno studio collaborativo chiamato BIOMED-2 Concerted Action.[2]

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 tre (3) master mix. Le master mix *IGK* Tube A (Provetta A) servono per identificare le regioni target variabile (V) e di giunzione (J) del locus della catena leggera kappa delle immunoglobuline. Invece le master mix *IGK* Tube B (Provetta B) servono per identificare i riarrangiamenti dell'elemento di delezione kappa (K_{de}) con la regione variabile (V) e la regione intragenica Jκ-Cκ. I riarrangiamenti Vκ-K_{de} e introne Jκ-Cκ-K_{de} che ne derivano sono il risultato di riarrangiamenti non riusciti che permangono nei linfociti B. La terza master mix, Specimen Control Size Ladder, identifica vari geni e genera una serie di ampliconi di 96, 197, 297, 397 e 602 coppie di basi (bp) 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 cellule B. Questi test amplificano il DNA tra i primer che identificano le regioni variabile (V) e di giunzione (J) (*IGK* Tube A (Provetta A)) o le regioni variabile, introne Jκ-Cκ e K_{de} (*IGK* Tube B (Provetta B)). Le regioni conservate V e J si trovano su entrambi i lati della regione 3 ipervariabile, determinante la complementarietà (CDR3) 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 la catena pesante e le catene leggere delle immunoglobuline nelle 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. Su un gel, questa distribuzione dei prodotti appare come una sbavatura (smear). Questa distribuzione gaussiana riflette la popolazione eterogenea dei riarrangiamenti V-J. (In alcuni casi, in cui non è presente DNA dei linfociti, non si osserva alcun prodotto.) 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.

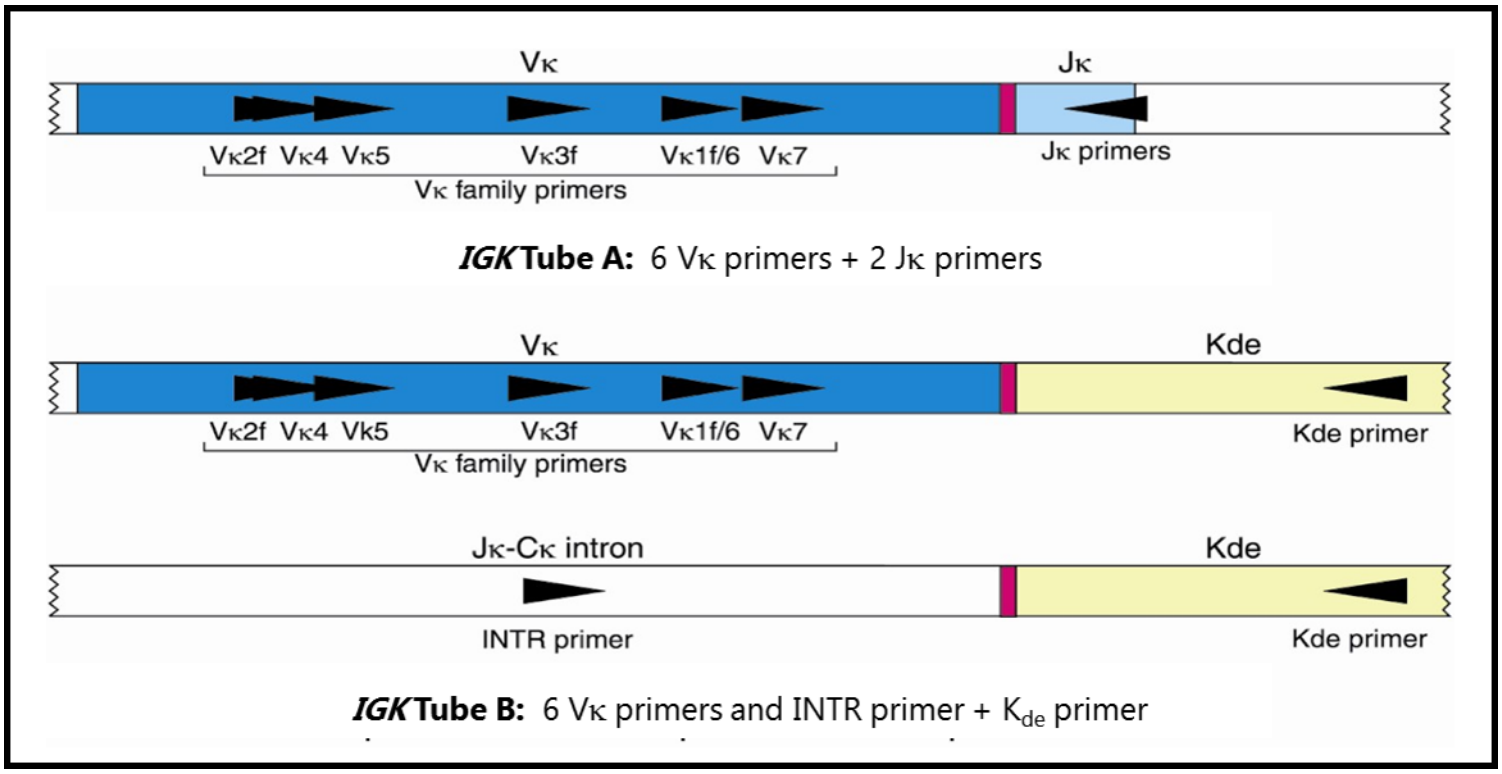

Figura 1. È raffigurata una rappresentazione semplificata dell'organizzazione di un gene della catena leggera kappa delle immunoglobuline riarrangiato sul cromosoma 2p11.2. Sono mostrati le posizioni e gli orientamenti relativi dei primer Vκ, Jκ e K_{de} inclusi nelle provette delle master mix *IGK*.

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 diverse dimensioni che formano una distribuzione gaussiana intorno a un riarrangiamento statisticamente favorito, di dimensioni medie. Per i riarrangiamenti Vκ-Jκ, la lunghezza di CDR3 è limitata e i riarrangiamenti in questa regione mostrano una distorsione significativa (platicurtosi).[4]

3.2. Rilevamento differenziale in fluorescenza

Il rilevamento differenziale in fluorescenza viene comunemente adoperato per risolvere 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 tal modo, i diversi coloranti fluorescenti potranno corrispondere a regioni bersaglio diverse. Questo sistema di rilevamento offre sensibilità ineguagliabile, risoluzione fino al singolo nucleotide, rilevamento differenziale dei prodotti e quantificazione relativa. Inoltre, permette di eliminare quasi totalmente l'impiego di gel di agarosio e poliacrilammide, così come l'uso di agenti cancerogeni quali il bromuro di etidio. Il rilevamento differenziale consente anche un'interpretazione accurata, riproducibile e obiettiva dei prodotti primer-specifici e l'archiviazione automatica dei dati. La riproducibilità inter- e intra-saggio della determinazione delle dimensioni mediante elettroforesi capillare è di circa 1-2 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. Kit disponibili

N. di catalogo	Descrizione	Quantità
REF 91020021	IdentiClone *IGK* Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 reazioni
REF 91020031	IdentiClone *IGK* Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 reazioni

Tabella 2. Componenti del reagente

Reagente	N. di catalogo (REF)	Componenti del reagente (ingredienti attivi)	Quantità unitaria	91020021 N. di unità	91020031 N. di unità	Temp. di conservazione
Master mix	21020011CE	*IGK* Tube 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	-85°C -65°C
	21020021CE	*IGK* Tube 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	20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM Oligonucleotidi multipli per geni housekeeping target.	1500 µL	1	10	
DNA di controllo positivo	40880370	IVS-0007 Clonal Control DNA 200 µg/mL di DNA in TE 1/10	100 µL	1	5	2°C 8°C o -85°C -65°C
DNA di controllo negativo (normale)	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA 200 µg/mL di DNA in 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 mescolare 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 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 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. Monitorare attentamente tutti i reagenti 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 del saggio 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 possono anche essere conservati a una temperatura compresa 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 completamente risospesi. 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 provviste di tappo a vite e o-ring, se necessario.

5. Strumenti

5.1. Termociclatore

- Uso o funzione: amplificazione dei campioni di DNA
- 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.
- Consultare 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:
  - Gli strumenti per elettroforesi capillare indicati di seguito soddisfano le esigenze prestazionali di questo saggio:
    - ABI 310 Genetic Analyzer (1-capillary) (Analizzatore genetico, 1 capillare)
    - ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (4-capillaries) (Analizzatore genetico, 4 capillari)
    - ABI 3100 Genetic Analyzer (16-capillaries) (Analizzatore genetico, 16 capillari)
    - ABI 3130 Genetic Analyzer (4-capillaries) (Analizzatore genetico, 4 capillari)
    - ABI 3130xL Genetic Analyzer (16-capillaries) (Analizzatore genetico, 16 capillari)
    - ABI 3500 Genetic Analyzer (8-capillaries) (Analizzatore genetico, 18 capillari)
    - ABI 3500xL Genetic Analyzer (24-capillaries) (Analizzatore genetico, 18 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 ma non forniti.*
- Utilizzare le impostazioni predefinite per il proprio polimero e tipo di 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 cationici divalenti
- Puntali per pipette a bassa ritenzione
- EDTA (non significativo a basse concentrazioni)
- Eparina

6.3. Requisiti e manipolazione dei campioni

Questo saggio permette di analizzare 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)
- 2 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 del campione

Estrarre il DNA genomico dai campioni del paziente il più presto 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
REF	21020011CE	*IGK* Tube A – 6FAM
REF	21020021CE	*IGK* Tube B – 6FAM
REF	20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM
REF	40880370	IVS-0007 Clonal Control DNA
REF	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA

7.2. Materiali necessari (non forniti)

Tabella 4: Materiali necessari (non forniti)

Reagente/Materiale	Reagenti/Materiali consigliati e produttori	Numero di catalogo	Note
DNA polimerasi	Roche: • EagleTaq DNA Polymerase Invivoscribe, Inc.: • FalconTaq DNA Polymerase o equivalente	05206944190 60970130	N/A
Acqua distillata in vetro, deionizzata per biologia molecolare o acqua purificata per uso farmaceutico	N/A	N/A	Sterile e priva di DNasi e RNasi.
Pipette calibrate	Rainin: • Pipette P-2, P-20, P-200 e P-1000 • o pipette SL-2, SL-20, SL-200 e SL-1000	N/A	Devono essere in grado di misurare con precisione volumi compresi tra 1 µL e 1000 µL.
Termociclatore	Thermo Fisher Scientific: • Veriti Dx Thermal Cycler Bio-Rad: • MJ Research PTC-100 o PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer • PE 9600 o PE 9700	N/A	N/A
Agitatore vortex	N/A	N/A	N/A
Piastre o provette per PCR	N/A	N/A	Sterili
Puntali per pipette con filtro	N/A	N/A	Privi di RNasi, DNasi, apirogeni, sterili
Provette per microcentrifuga	N/A	N/A	Sterili
Strumento per elettroforesi capillare ABI	Applied Biosystems: • ABI serie 310, 3100 o 3500	N/A	N/A
Formammide Hi-Di	Applied Biosystems: • Hi-Di™ Formamide	4311320	N/A
Standard di riferimento	Invivoscribe. Inc.: • Hi-Di Formamide con standard di riferimento ROX per ABI 3100 Applied Biosystems: • Per strumenti ABI 3100 o 3130: o GeneScan™ - 400HD [ROX]™ • Per strumenti ABI 3500: • GeneScan - 600 [LIZ]™ v2.0	60980061 402985 4408399	N/A
Set di coloranti per calibrazione spettrale	Applied Biosystems: • Per strumenti ABI 3100 e 3130: o Matrix Standard Kit (Dye Set D) DS-30 • Per strumenti ABI 310: o Matrix Standard NED o e Fluorescent Amidite Matrix Standards o [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX] • Per strumenti ABI 3500: o Matrix Standard Kit (Dye Set G5) DS-33	4345827 402996 401546 4345833	N/A
Polimero	Applied Biosystems: • POP-4™ Polymer: o POP-4 per 310 Genetic Analyzers o POP-4 per 3100/3100-Avant Genetic Analyzers o POP-4 per 3130/3130xL Genetic Analyzers • POP-7™ Polymer: o POP-7 per 3130/3130xL Genetic Analyzers o POP-7 per 3500/3500xL Genetic Analyzers	402838 4316355 4352755 4352759 4393714	N/A
Tampone	Applied Biosystems: • 10X tampone Genetic Analyzer con EDTA	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 consiglia 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 templato** devono essere analizzati per ciascuna master mix.

7.3.1. Indossando i guanti, prelevare 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 Controlli positivi raccomandati*)
+ 1	DNA di controllo negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	controllo senza templato (acqua)
+ 1	per compensare errori di pipettamento
n = 2 × n. di campioni + 4	**Totale**

- Pertanto, il volume totale delle aliquote per ogni master mix deve essere **n × 45 µL**.
- Per la master mix Specimen Control Size Ladder, 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 templato (acqua)
+ 1	per compensare errori di pipettamento
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 DNA polimerasi Taq 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 templato appropriato (DNA del campione, DNA di controllo positivo, DNA di controllo negativo o acqua) nei singoli pozzetti contenenti le rispettive soluzioni master mix.

- Pipettare su e giù diverse volte 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 templato appropriato a ciascun pozzetto.
Volume reazione totale = **50 µL**

7.4. Amplificazione

7.4.1. Amplificare i campioni con il seguente programma di PCR:

- Utilizzare l'opzione "calculated" (calcolato) per la misura di temperatura con i BioRad MJ Research PTC termociclatori.

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 va effettuato entro 30 giorni dall'amplificazione.

7.5. Rilevamento della fluorescenza ABI

Si tenga presente che per il rilevamento della fluorescenza ABI è spesso visibile un picco precedente, ma si tratta di un artefatto dovuto al metodo di rilevamento utilizzato dalle piattaforme ABI. I picchi precedenti sono talvolta distorti e presentano basi in pendenza sul lato destro verso il picco vero e proprio. Ciò è particolarmente evidente nella master mix Specimen Control Size Ladder, 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 provenienti da 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 95ºC per 2 minuti, quindi abbassare rapidamente la temperatura su ghiaccio per 5 minuti.

7.5.6. Preparare un foglio 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 relativo manuale.

- I dati vengono visualizzati automaticamente come picchi di dimensione e colore specifici.

7.5.8. Esaminare il profilo e i controlli, elaborare un report dei risultati. (Consultare 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 reazione) 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 reazione.

7.5.11. Trasferire 0,5 µL di ciascuna reazione 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 95ºC per 3 minuti, quindi abbassare rapidamente la temperatura trasferendoli direttamente su ghiaccio per 5 minuti.

7.5.14. Preparare un foglio 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 manuale d'uso.

- I dati vengono visualizzati automaticamente come picchi di dimensione e colore specifici.

7.5.16. Esaminare il profilo e i controlli, elaborare un report dei risultati. (Vedere le sezioni 8 *Interpretazione dei risultati* e 10 *Valori attesi*.)

7.6. Controllo di qualità

Con il kit sono forniti controlli positivi e negativi (o normali), che possono essere analizzati in singolo ogni volta che si effettua il saggio per garantire che sia stato eseguito correttamente. Inoltre, occorre eseguire un controllo senza templato (*ad es.* acqua) per verificare l'eventuale contaminazione della master mix o la contaminazione crociata delle reazioni, dovuta all'impiego di una tecnica sterile impropria. È possibile anche aggiungere un controllo costituito da tampone per assicurarsi 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 Dimensioni attese dei prodotti amplificati*. Invivoscribe offre controlli aggiuntivi e controlli di sensibilità (diluizioni di controlli positivi nel nostro 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 specifico strumento per elettroforesi capillare in uso 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 identificate, le dimensioni degli ampliconi determinate sulla propria piattaforma specifica saranno coerenti tra i vari test. Questa riproducibilità è estremamente utile nel monitoraggio della recidiva di 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: Controlli positivi raccomandati

Master mix	Bersaglio	Colore	DNA di controllo	N. di catalogo	Dimensioni del prodotto in nt
IGK Tube A	Vκ-Jκ	Blu	**Range di dimensioni valide** IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40880370	**120 - 160, 190 - 210, 260 - 300** 143
IGK Tube B	Vκ-K_{de} + introne-K_{de}	Blu	**Range di dimensioni valide** IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40880370	**210 - 250, 270 - 300, 350 - 390** 274, 282
Specimen Control Size Ladder	Geni multipli	Blu	**Range di dimensioni valide** IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	**96, 197, 297, 397, 602[a]** 96, 197, 297, 397, 602[a]

[a]Nota: 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. Per il rilevamento della fluorescenza ABI, il picco di 602 nt potrebbe non apparire durante i normali tempi di esecuzione. Inoltre, la dimensione di questo picco può discostarsi di oltre 30 nt quando la dimensione del frammento viene estrapolata usando standard di riferimento GeneScan - 400HD [ROX].

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 possono essere refertati come "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. Occorre 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 anomalo
Controllo senza templato	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 Dimensione attesa dei prodotti amplificati*. 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 Dimensione attesa dei prodotti amplificati*. Continuare con l'analisi.	Ripetere il saggio.
Specimen Control Size Ladder (Questo controllo di amplificazione è essenziale 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 a meno che il campione non risulti positivo. Se sono visibili solo 1, 2, o 3 bande, rivalutare il campione per verificare l'eventuale degradazione del DNA, a meno che il campione non risulti positivo.

8.2. Interpretazione del campione

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

- Uno o due picchi positivi 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 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 picchi positivi[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 delle immunoglobuline**."

[a]Nota: i criteri per la definizione di un picco positivo sono i seguenti:

- I prodotti generati da **campioni diagnostici** 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; o 2) superano l'ampiezza dei picchi limitrofi adiacenti e sono identici in dimensione agli ampliconi 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. Dimensioni attese dei prodotti amplificati

Le dimensioni degli ampliconi indicate sono state determinate utilizzando una piattaforma ABI. Le dimensioni degli ampliconi osservate sullo specifico strumento per elettroforesi capillare in uso 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 identificate, le dimensioni degli ampliconi determinate sulla propria piattaforma specifica saranno coerenti tra i vari test. Questa riproducibilità è estremamente utile nel monitoraggio della recidiva di 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 8: Dimensioni attese dei prodotti amplificati

Master mix	Bersaglio	Colore	DNA di controllo	N. di catalogo	Dimensioni del prodotto in nucleotidi (nt)
IGK Tube A	Vκ - Jκ	Blu	**Range di dimensioni valide** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880370	**120-160, 190-210, 260-300** 135-155[a] 143
IGK Tube B	Vκ-K_{de} + introne-K_{de}	Blu	**Range di dimensioni valide** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880370	**210-250, 270-300, 350-390** 225-245, 265-285, 404[a,b] 274, 282
Specimen Control Size Ladder	Geni multipli	Blu	**Range di dimensioni valide** IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	**96, 197, 297, 397, 602[c]** 96, 197, 297, 397, 602[c]

[a]Nota: 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.[4]

[b]Nota: 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 questo picco all'interno dello stesso esperimento. Se è presente un picco, si considera pertanto non specifico.

[c]Nota: 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. Per il rilevamento della fluorescenza ABI, il picco di 602 nt potrebbe non apparire durante i normali tempi di esecuzione. Inoltre, la dimensione di questo picco può discostarsi di oltre 30 nt quando la dimensione del frammento viene estrapolata usando standard di riferimento GeneScan - 400HD [ROX] .

10.2. Dati del campione

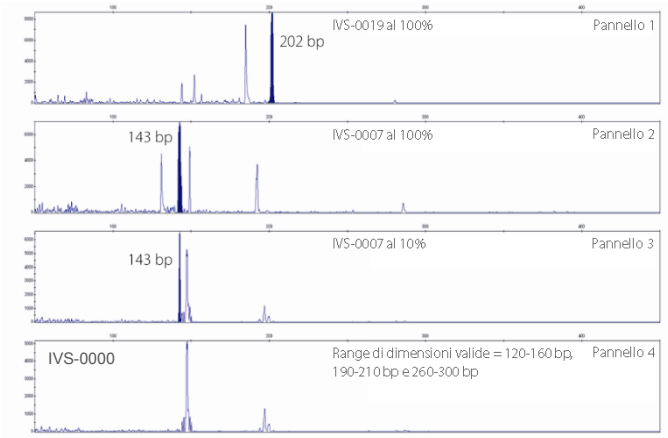

Figura 2. *IGK* Tube A

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

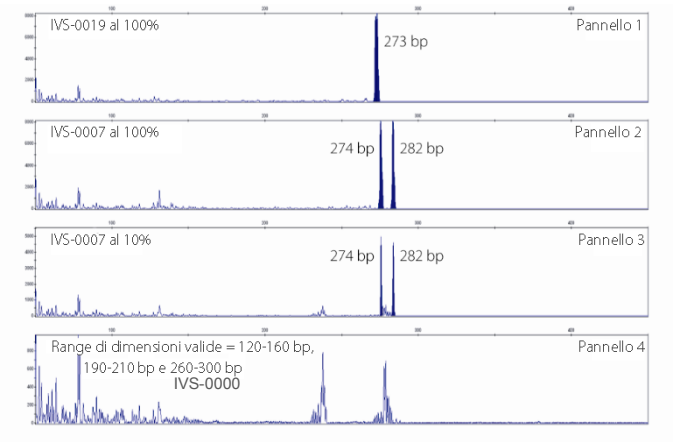

Figura 3. *IGK* Tube B

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

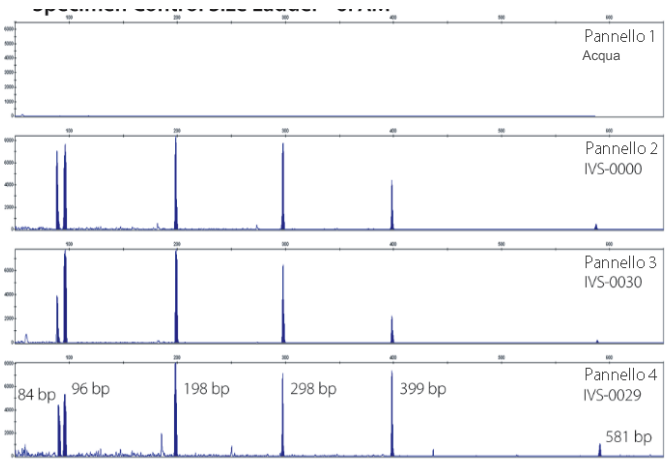

Figura 4. La master mix Specimen Control Size Ladder.

11. Caratteristiche prestazionali

Il saggio in PCR IdentiClone *IGK* Gene Clonality 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]	
IGH:	93% sensibilità/ 92% specificità	*IGH* + *IGK*:	85% sensibilità
IGK:	90% sensibilità/ 90% specificità		
IGL:	86% sensibilità/ 92% specificità		
TCRB:	86% sensibilità/ 98% specificità	*TCRB*:	85% sensibilità
TCRG:	89% sensibilità/ 94% specificità		
TCRD:	83% sensibilità/ 95% specificità		

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

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

Lo studio di Sandberg *et al.* è uno studio indipendente di 300 campioni di pazienti provenienti da vari tipi di campioni. 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 (7) 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. An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Mol. Diag*. 1999, **4(2)**:101-117.
2. Van Dongen, JJM *et al*. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003, **17(12)**:2257-2317.
3. Sandberg, Y, van Gastel-Mol, EJ, Verhaaf, B, Lam, KH, van Dongen, JJM, Langerak, AW. BIOMED-2 multiplex immunoglobulin/T-cell receptor polymerase chain reaction protocols can reliably replace Southern Blot analysis in routine clonality diagnostics. *J. Mol. Diag*. 2005, **7(4)**:495-503.
4. Rock, EP, Sibbald, PR, Davis, MM, Chein, YH. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J. Exp. Med*. 1994, **179(1)**:323-328.
5. van Krieken, JHJM, *et al*. Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2007, **21(2)**:201-206.

13. Assistenza tecnica e Servizio clienti

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

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.

14. Simboli

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

REF	Numero di catalogo		Data di scadenza
VOL	Volume del reagente	EC REP	Rappresentante autorizzato nella Comunità europea
LOT	Numero di lotto		Consultare le istruzioni per l'uso
	Condizioni di conservazione	IVD	Per uso diagnostico *in vitro*
UDI	Identificatore Dispositivo Univoco		Produttore
UK CA	Conformità Britannica Valutata	UKRP	Persona responsabile nel Regno Unito
CH REP	Rappresentante Autorizzato per la Svizzera	CE	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.