IdentiClone®

Instrucciones de uso

IdentiClone® *TCRB* + *TCRG* T-cell Clonality Assay

CE UKCA IVD

Para la identificación de reordenamientos del gen del receptor de linfocitos T de las cadenas beta y gamma.

IVD Para uso diagnóstico *in vitro*

invivoscribe®

Condiciones de conservación: **de –85ºC a –65ºC**

Los controles de ADN pueden separarse de los kits de prueba y conservarse a entre 2°C y 8°C.

Núm. de catálogo	Productos	Cantidad
REF 92000011	IdentiClone *TCRB* + *TCRG* T-cell Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 reacciones
REF 92000021	IdentiClone *TCRB* + *TCRG* T-cell Clonality MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 reacciones

Índice

1. USO PREVISTO 3

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA 3

2.1. Antecedentes 3
2.2. Descripción general 3

3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO 4

3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 4
3.2. Detección mediante fluorescencia diferencial 5

4. REACTIVOS 5

4.1. Componentes de los reactivos 5
4.2. Advertencias y precauciones 6
4.3. Almacenamiento y manipulación 6

5. INSTRUMENTAL 7

5.1. Termociclador 7
5.2. Instrumental de electroforesis capilar ABI 7

6. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS 8

6.1. Precauciones 8
6.2. Sustancias interferentes 8
6.3. Requisitos y manipulación de las muestras 8
6.4. Preparación de las muestras 8
6.5. Conservación de las muestras 8

7. PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA 9

7.1. Materiales suministrados 9
7.2. Materiales necesarios no suministrados 9
7.3. Preparación de los reactivos 10
7.4. Amplificación 11
7.5. Detección por fluorescencia ABI 11
7.6. Control de calidad 12
7.7. Controles positivos recomendados 12

8. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS 13

8.1. Análisis 13
8.2. Interpretación de la muestra 14

9. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO 14

10. VALORES PREVISTOS 14

10.1. Tamaño previsto de los productos amplificados 14
10.2. Datos de la muestra 15

11. EFICACIA DIAGNÓSTICA 16

12. SERVICIO TÉCNICO Y ATENCIÓN AL CLIENTE 17

13. BIBLIOGRAFÍA 17

14. SÍMBOLOS 17

15. AVISO LEGAL 18

15.1. Garantía y responsabilidad 18
15.2. Patentes y marcas registradas 18

1. Uso previsto

La IdentiClone *TCRB* + *TCRG* T-cell Clonality Assay es un producto de diagnóstico *in vitro* diseñado para la detección mediante PCR de reordenamientos del gen del receptor de linfocitos T de las cadenas beta y gamma en pacientes con sospecha de trastornos linfoproliferativos. La *TCRB* + *TCRG* T-cell Clonality Assay sirve específicamente para:

- Identificar la presencia de clonalidad en posibles trastornos linfoproliferativos.
- Respaldar un diagnóstico diferencial de lesiones reactivas y neoplasias malignas de los linfocitos T y de algunos linfocitos B inmaduros.
- Determinar la implicación de la estirpe en los trastornos linfoproliferativos maduros.
- Controlar y evaluar las recidivas de la enfermedad.

2. Resumen y explicación de la prueba

2.1. Antecedentes

El reordenamiento de los genes de los receptores de antígenos se produce durante la ontogenia de los linfocitos B y T. Estos reordenamientos génicos generan productos únicos en materia de longitud y secuencia. Por eso, las pruebas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sirven para identificar poblaciones de linfocitos derivadas de una única célula mediante la detección del reordenamiento de los genes V-J del locus del receptor de antígenos.[1] En la prueba por PCR IdentiClone, se utilizan distintos cebadores de ADN que se dirigen a regiones genéticas conservadas de los genes del receptor de linfocitos T de las cadenas beta y gamma. Esta prueba, basada en ADN, sirve para detectar la gran mayoría de las neoplasias de los linfocitos T clonales. Los resultados de la prueba pueden analizarse con distintos métodos de detección, como la electroforesis en gel y capilar.

Los análisis de reordenamiento del gen también pueden realizarse mediante la técnica de Southern (SB). A pesar de que el análisis mediante SB es muy fiable, este se sustituye cada vez más por técnicas de PCR, que presentan una mayor eficacia y sensibilidad. Además, la PCR es más sencilla y menos tediosa y necesita mucha menos cantidad de ADN de alto peso molecular que las pruebas mediante SB. Por otro lado, las pruebas por PCR pueden realizarse con ADN aislado de tejido parafinado; este no es el caso de las pruebas por SB, pues el ADN suele estar degradado. Por lo tanto, es muy necesario reemplazar las pruebas por SB por pruebas por PCR fiables.

2.2. Descripción general

Las pruebas IdentiClone de Invivoscribe representan un nuevo enfoque para las pruebas de clonalidad mediante PCR. Estas pruebas se han optimizado minuciosamente mediante el análisis de muestras de control positivas y negativas con mezclas maestras múltiples. Tras el desarrollo de la prueba, se completó una importante fase de validación, que incluyó el análisis de más de 400 muestras clínicas de acuerdo con la clasificación Revised European/American Lymphoma (REAL). Este análisis se realizó en más de 30 conocidos centros de análisis de toda Europa, como parte de un estudio colaborativo denominado BIOMED-2 Concerted Action. Los resultados del estudio BIOMED-2 aparecen en *Leukemia*, una importante revista con revisión científica externa[2]. En un artículo de 2007 de Leukemia, las pruebas de reordenamiento de los genes *TCRB* y *TCRG* presentaron una sensibilidad del 94 % frente al 91 % de las de *TCRB* y el 89 % de las de *TCRG* cuando se hizo la prueba por separado. Es posible que aumente la fiabilidad de las pruebas, pues los productos clonales podrían detectarse en más de un tubo.[4]

Las pruebas de detección mediante ABI no detectan de forma fiable aquellas poblaciones clonales que representan menos del 1 % de la población de linfocitos total. Los resultados de las pruebas de clonalidad molecular siempre deben interpretarse en el contexto de los datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos disponibles.

Este kit de prueba incluye 6 mezclas maestras. Los *TCRB* Tubes A y B (Tubos A y B de *TCRB*) se dirigen a las regiones marco de la región variable y la región de unión del locus de la cadena beta de *TCR*. El *TCRB* Tube C (Tubo C de *TCRB*) se dirige a las regiones de diversidad y unión del locus de la cadena beta de *TCR*. El *TCRG* Tube A (Tubo A de *TCRG*) contiene una serie de cebadores que se dirige a los genes Vγ1-8 + Vγ10 y los genes Jγ1.1, Jγ1.3, Jγ2.1 y Jγ2.3 (también conocidos como JγP1, Jγ1, JγP2 y Jγ2, respectivamente). El *TCRG* Tube B (Tubo B de *TCRG*) contiene una serie de cebadores que se dirige a los genes Vγ9 + Vγ11 y los genes Jγ1.1, Jγ1.3, Jγ2.1 y Jγ2.3. Finalmente, la mezcla maestra Specimen Control Size Ladder (Control de la muestra con marcador de tamaño) se dirige a distintos genes para generar una serie de amplicones de aproximadamente 96, 197, 297, 397 y 602 pares de bases y garantizar que la calidad y la cantidad de ADN sean suficientes para que el resultado sea válido. En todas nuestras pruebas de clonalidad génica, se usa el mismo programa del termociclador y métodos de detección similares. Esto mejora la uniformidad y facilita la formación cruzada sobre distintas pruebas.

Esta prueba se basa en EuroClonality/BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.

3. Principios del procedimiento

3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las pruebas por PCR suelen utilizarse para identificar poblaciones clonales de linfocitos T. Estas pruebas amplifican el ADN situado entre cebadores dirigidos a las regiones variables (V) conservadas y las regiones de unión (J) conservadas (*TCRB* Tubes A & B [Tubos A y B de *TCRB*] y *TCRG* Tubes A & B [Tubos A y B de *TCRG*]), así como a las regiones de diversidad (D) y de unión (*TCRB* Tube C [Tubo C de *TCRB*]). Las regiones de conservación se encuentran a ambos lados de la región V-J en la que se producen los reordenamientos génicos programados durante la maduración de los linfocitos B y T. Los genes del receptor de antígenos sujetos a reordenamiento son la cadena pesada de la inmunoglobulina, las cadenas ligeras de los linfocitos B y los genes del receptor de linfocitos T de los linfocitos T. Cada linfocito B y T presenta un solo reordenamiento V-J productivo que es único en longitud y en secuencia. Cuando el ADN de una población normal o policlonal se amplifica usando los cebadores de ADN que flanquean la región V-J, se genera una curva en forma de campana (distribución de Gauss) de amplicones que se ajustan al intervalo de tamaños previsto. Esta distribución de Gauss refleja la heterogeneidad de los reordenamientos en V-J (en ciertos casos, en ausencia de ADN de los linfocitos, no se detecta el producto). El ADN de las muestras de población clonal da lugar a uno o dos productos amplificados prominentes (amplicones) en un fondo policlonal disminuido.

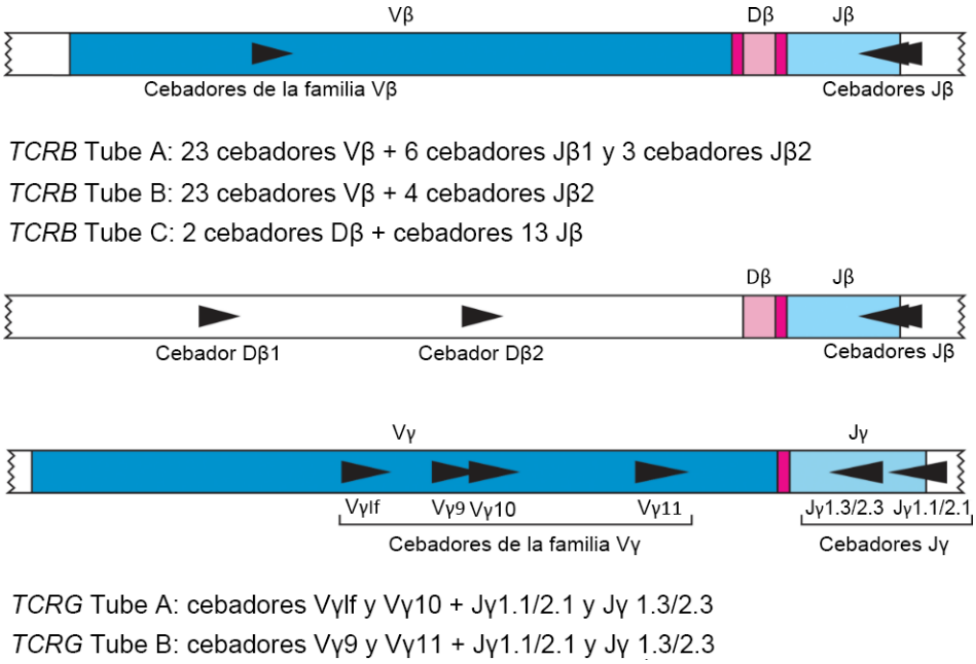

Figura 1. Este es un diagrama simplificado de un reordenamiento representativo del gen del receptor de linfocitos T de la cadena beta y el gen del receptor de linfocitos T de la cadena gamma que representa la colocación aproximada de los cebadores de ADN corriente arriba y corriente abajo. Aparecen los números de los cebadores y su especificidad para los Tubos A, B y C de *TCRB* y los Tubos A y B de *TCRG* de la mezcla maestra. El cebador de Vγ1f es un cebador de consenso que se dirige desde Vγ1 hasta Vγ8).

Dado que los genes del receptor de antígenos son polimórficos (están formados por una población heterogénea de secuencias de ADN relacionadas), es difícil emplear un solo conjunto de secuencias de cebadores de ADN para dirigirse a todas las regiones de conservación que flanquean el reordenamiento V-J. La diversidad de la región N y la mutación somática mezclan aún más las secuencias de ADN en estas regiones. Por lo tanto, son necesarias mezclas maestras múltiples, dirigidas a distintas regiones FR, para identificar la mayor parte de los reordenamientos clonales. Los reordenamientos clonales se identifican como productos prominentes de un solo tamaño en un fondo de amplicones de distintos tamaños que forman una distribución de Gauss en torno a un reordenamiento estadísticamente favorecido de tamaño medio.

3.2. Detección mediante fluorescencia diferencial

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

4. Reactivos

4.1. Componentes de los reactivos

Tabla 1. Kits disponibles

Número de catálogo	Producto	Cantidad
REF 92000011	IdentiClone *TCRB* + *TCRG* T-cell Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 reacciones
REF 92000021	IdentiClone *TCRB* + *TCRG* T-cell Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 reacciones

Tabla 2. Componentes de los reactivos

Reactivo	Número de catálogo	Componentes de los reactivos (principios activos)	Cant. por unidad	92000011 Número de unidades	92000021 Número de unidades	Temp. de conser-vación
Mezclas maestras	22050011CE	*TCRB* Tube A – 6FAM & HEX Distintos oligonucleótidos dirigidos a las regiones Vβ + Jβ1 + Jβ2 del gen del receptor de linfocitos T de la cadena beta en una solución salina amortiguada.	1500 µL	1	10	-85 °C -65 °C
	22050021CE	*TCRB* Tube B – 6FAM Distintos oligonucleótidos dirigidos a las regiones Vβ + Jβ2 del gen del receptor de linfocitos T de la cadena beta en una solución salina amortiguada.	1500 µL	1	10	
	22050031CE	*TCRB* Tube C - 6FAM & HEX Distintos oligonucleótidos dirigidos a las regiones Dβ + Jβ1 + Jβ2 del gen del receptor de linfocitos T de la cadena beta en una solución salina amortiguada.	1500 µL	1	10	
	22070031CE	*TCRG* Tube A – 6FAM & HEX Distintos oligonucleótidos dirigidos a las regiones Vγ1-8, Vγ10 + múltiples regiones Jγ del gen del receptor de linfocitos T de la cadena gamma en una solución salina amortiguada.	1500 µL	1	10	
	22070041CE	*TCRG* Tube B – 6FAM & HEX Distintos oligonucleótidos dirigidos a las regiones Vγ9, Vγ11 + múltiples regiones Jγ del gen del receptor de linfocitos T de la cadena gamma en una solución salina amortiguada.	1500 µL	1	10	
Mezcla maestra del control de amplificación	20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM Distintos oligonucleótidos dirigidos a los genes de mantenimiento.	1500 µL	1	10	

Tabla 2. Componentes de los reactivos

Reactivo	Número de catálogo	Componentes de los reactivos (principios activos)	Cant. por unidad	92000011 Número de unidades	92000021 Número de unidades	Temp. de conser-vación
ADN de control positivo	40881210	**IVS-0021 Clonal Control DNA** 200 µg/mL de ADN en TE 1/10	100 µL	1	5	2 °C – 8 °C o -85 °C – -65 °C
	40880490	**IVS-0009 Clonal Control DNA** 200 µg/mL de ADN en TE 1/10	100 µL	1	5	
	40880190	**IVS-0004 Clonal Control DNA** 200 µg/mL de ADN en TE 1/10	100 µL	1	5	
ADN de control negativo (normal)	40920010	**IVS-0000 Polyclonal Control DNA** 200 µg/mL de ADN en TE 1/10	100 µL	1	5	

Nota: La fabricación de estos kits no implica el uso de conservantes.

4.2. Advertencias y precauciones

- **IVD** Este producto es para uso diagnóstico *in vitro*.
- Utilice este kit de análisis a modo de sistema. No utilice reactivos de otros fabricantes. Cualquier alteración del protocolo —como la realización de diluciones o reducciones de las reacciones de amplificación— puede afectar al rendimiento de la prueba e implicar la anulación de cualquier garantía derivada de la adquisición de estos kits.
- Los materiales son estables hasta la fecha de caducidad indicada cuando se almacenan y manipulan según las instrucciones. No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
- El cumplimento del protocolo garantizará un rendimiento y una reproducibilidad óptimos. Asegúrese de usar el programa adecuado del termociclador, ya que, si usa otros programas, los resultados podrían ser imprecisos o erróneos y dar lugar a falsos positivos y falsos negativos.
- No mezcle ni combine reactivos de kits con diferentes números de lote.
- El personal de laboratorio debe usar equipos de protección personal estándar, seguir las prácticas óptimas de laboratorio y tomar las precauciones necesarias cuando trabaje con muestras. Manipule las muestras en instalaciones aprobadas de contención de seguridad biológica y ábralas solo en campanas de seguridad biológica certificadas. Use agua para procedimientos de biología molecular a la hora de preparar el ADN de la muestra.
- Dado que se trata de una prueba de sensibilidad analítica, debe ser extremadamente cauteloso para evitar la contaminación de los reactivos o mezclas de amplificación con muestras, material de referencia o material amplificado. Preste mucha atención a los reactivos para detectar posibles signos de contaminación (p. ej., controles negativos con señales positivas). Elimine cualquier reactivo que pueda haberse contaminado.
- Para reducir al mínimo la contaminación, use guantes limpios cuando manipule muestras y reactivos y limpie de manera regular las zonas de trabajo y las pipetas antes de realizar la PCR.
- La esterilización por autoclave no elimina la contaminación del ADN. En el laboratorio de PCR, siga una secuencia de trabajo unidireccional entre zonas de trabajo: zona de preparación de mezclas maestras, zona de preparación de muestras, zona de amplificación y zona de detección. No lleve ADN amplificado a las zonas designadas para la preparación de mezclas maestras y muestras.
- Las pipetas, puntas de pipetas y cualquier otro instrumento utilizado en una zona específica deben ser de uso exclusivo de dicha zona.
- Siempre que sea posible, utilice material plástico estéril desechable para evitar la contaminación con RNasa y DNasa o la contaminación cruzada.

4.3. Almacenamiento y manipulación

- Si no va a hacer un uso inmediato de los kits de prueba, **consérvelos a una temperatura de entre −85°C y −65°C.**
- La temperatura de conservación óptima para los controles de ADN es de entre 2°C y 8°C, pero los controles de ADN pueden conservarse a entre −85°C y −65°C.
- Tanto los reactivos como el material de referencia deben descongelarse y mezclarse en un agitador vorticial antes de usarse para garantizar la resuspensión. Una agitación vorticial excesiva puede dañar el ADN y hacer que los cebadores marcados pierdan sus fluoróforos.
- Los materiales son estables hasta la fecha de caducidad indicada cuando se almacenan y manipulan según las instrucciones. No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
- Debido a las altas concentraciones de sal, las mezclas maestras para PCR son sensibles a los ciclos de congelación/descongelación. Vierta las mezclas maestras en tubos estériles con cierre roscado y junta tórica si es necesario.

5. Instrumental

5.1. Termociclador

- Uso o función: amplificación de muestras de ADN
- Instrumental recomendado: termociclador Veriti™ o equivalente
- Eficacia diagnóstica y características técnicas:
  - Intervalo térmico mínimo: 15-96°C
  - Velocidad de aceleración mínima: 0,8°C/s
- Siga las instrucciones de instalación, uso, calibración y mantenimiento del fabricante
- Consulte el apartado 7.4, *Amplificación*, para conocer el programa del termociclador

5.2. Instrumental de electroforesis capilar ABI

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

6. Recogida y preparación de las muestras

6.1. Precauciones

Las muestras biológicas procedentes de seres humanos pueden contener materiales posiblemente infecciosos. Manipule las muestras de acuerdo con la norma de la OSHA sobre patógenos de transmisión hemática y de acuerdo con un nivel de bioseguridad 2.

6.2. Sustancias interferentes

Las siguientes sustancias pueden interferir con la PCR:

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

6.3. Requisitos y manipulación de las muestras

Con este kit, puede analizarse **ADN genómico** con los siguientes orígenes:

- 5 cc de sangre periférica, biopsia de médula ósea o aspirado de médula ósea anticoagulado con heparina o EDTA (conservados a entre 2°C y 8°C y enviados a temperatura ambiente)
- 5 mm cúbicos de tejido como mínimo (conservados y enviados congelados o conservados y enviados en RPMI 1640 a temperatura ambiente o en hielo)
- 3 µg de ADN genómico (conservados a entre 2°C y 8°C y enviados a temperatura ambiente)
- Tejido o cortes fijados en formol e incluidos en parafina (conservados y enviados a temperatura ambiente)

6.4. Preparación de las muestras

Extraiga el ADN genómico de las muestras de los pacientes lo antes posible. Vuelva a suspender el ADN en concentraciones finales de entre 100 µg y 400 µg por mL en TE 1/10 (1 mM de Tris-HCl, pH 8,0 y 0,1 mM de EDTA) o en agua para procedimientos de biología molecular o que reúna las condiciones de la USP. Este es un sistema de pruebas sólido. Los resultados válidos derivan de un amplio abanico de concentraciones de ADN. Por lo tanto, cuantificar y ajustar las concentraciones de ADN no suele ser necesario. Analizar el ADN de la muestra con la mezcla maestra Specimen Control Size Ladder (Control de la muestra con marcador de tamaño) garantizará que la calidad y la cantidad del ADN sean suficientes para que el resultado sea válido.

6.5. Conservación de las muestras

Conserve el ADN genómico a entre 2°C y 8°C o a entre −85°C y −65°C hasta que vaya a usarlo.

7. Procedimiento de la prueba

7.1. Materiales suministrados

Tabla 3. Materiales suministrados

Número de catálogo	Descripción
REF 22050011CE	*TCRB* Tube A – 6FAM & HEX
REF 22050021CE	*TCRB* Tube B – 6FAM
REF 22050031CE	*TCRB* Tube C – 6FAM & HEX
REF 22070031CE	*TCRG* Tube A – 6FAM & HEX
REF 22070041CE	*TCRG* Tube B – 6FAM & HEX
REF 20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM
REF 40881210	IVS-0021 Clonal Control DNA
REF 40880490	IVS-0009 Clonal Control DNA
REF 40880190	IVS-0004 Clonal Control DNA
REF 40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA

7.2. Materiales necesarios no suministrados

Tabla 4. Materiales necesarios no suministrados

Reactivo o material	Reactivo o material recomendado y proveedor	Número de catálogo	Notas
ADN polimerasa	Roche: • EagleTaq DNA Polymerase Invivoscribe: • FalconTaq DNA Polymerase o equivalente	05206944190 60970130	N. P.
Agua de calidad USP o para biología molecular desionizada y destilada en vidrio	N. P.	N. P.	Exenta de DNasa y RNasa
Pipetas calibradas	Rainin: • Pipetas P-2, P-20, P-200 y P-1000 • O pipetas SL-2, SL-20, SL-200 y SL-1000	N. P.	Deben ser capaces de medir con precisión volúmenes de entre 1 µL y 1000 µL
Termociclador	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. P.	N. P.
Agitador vorticial	N. P.	N. P.	N. P.
Placas o tubos para PCR	N. P.	N. P.	Estériles
Puntas de pipeta con filtro	N. P.	N. P.	Estériles y exentas de RNasa, DNasa y pirógenos
Tubos para microcentrífuga	N. P.	N. P.	Estériles
Instrumento de electroforesis capilar ABI	Thermo Fisher Scientific: • ABI 310, 3100 o 3500 series	N. P.	N. P.
Formamida Hi-Di	Thermo Fisher Scientific: • Hi-Di™ Formamide	4311320	N. P.
Patrones de tamaño	Invivoscribe: ▪ Hi-Di Formamide con patrones de tamaño ROX para ABI 3100 Thermo Fisher Scientific: ▪ Para ABI 3100 o 3130 instruments: ▪ GeneScan™ - 400HD [ROX]™ ▪ Para ABI 3100 o 3130 instruments: ▪ GeneScan™ - 400HD [ROX]™	60980061 402985 4408399	N. P.

Tabla 4. Materiales necesarios no suministrados

Reactivo o material	Reactivo o material recomendado y proveedor	Número de catálogo	Notas
Colorantes para calibración espectral	Thermo Fisher Scientific: • Para ABI 3100 y 3130 instruments: ▪ DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D) • Para ABI 310 instruments: ▪ NED Matrix Standard ▪ Y Fluorescent Amidite Matrix Standards [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX] • Para ABI 3500 instruments: ▪ DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5)	 4345827 402996 401546 4345833	N. P.
Polímero	Thermo Fisher Scientific: • POP-4™ Polymer: ▪ POP-4 para 310 Genetic Analyzers ▪ POP-4 para 3100/3100-Avant Genetic Analyzers ▪ POP-4 para 3130/3130xL Genetic Analyzers • POP-7™ Polymer: ▪ POP-7 para 3130/3130xL Genetic Analyzers ▪ POP-7 para 3500/3500xL Genetic Analyzers	 402838 4316355 4352755 4352759 4393714	N. P.
Solución amortiguadora	Thermo Fisher Scientific: • 10X Genetic Analyzer Buffer with EDTA	 402824	Diluir 1:10 en agua estéril antes de usar

7.3. Preparación de los reactivos

- Analice todas las muestras desconocidas usando la mezcla maestra Specimen Control Size Ladder para garantizar la ausencia de inhibidores de la amplificación y la presencia de la cantidad y la calidad necesarias del ADN para generar un resultado válido.
- Los resultados de las pruebas realizadas una sola vez son válidos. No obstante, recomendamos que analice **por duplicado** siempre que sea posible. Si los análisis por duplicado arrojan resultados incoherentes, será necesario realizar un nuevo análisis de la muestra.
- **Analice los controles positivos, negativos** y **sin molde** de cada mezcla maestra.
- Se recomienda combinar varias muestras en un mismo desarrollo para evitar quedarse sin el control negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA). Si en el laboratorio no resulta práctico combinar muestras, puede comprar el IVS-0000 Polyclonal Control DNA por separado.

7.3.1. Póngase los guantes para sacar las mezclas maestras del congelador. Deje que los tubos se descongelen. A continuación, mezcle en el agitador vorticial.

7.3.2. Encienda la campana de extracción o la cabina para PCR y pipetee una parte de cada mezcla maestra a los tubos para microcentrífuga, que deberán estar esterilizados y limpios.

- Volúmenes de las partes: 45 µL por reacción.
- Añada una reacción adicional por cada 15 reacciones para corregir errores de pipeteo.
- Para cada mezcla maestra (excepto para la Specimen Control Size Ladder), el número de reacciones (**n**) es:

n = 2 × núm. de muestras	(analice las muestras por duplicado)
+ 1	ADN de control positivo (consulte la Tabla 6)
+ 1	ADN de control negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	Control sin molde (agua)
+ 1	Para corregir errores de pipeteo
n = 2 × núm. de muestras + 4	**Total**

- Por lo tanto, el volumen total de la parte para cada mezcla maestra es **n × 45 µL**.
- Para la mezcla maestra Specimen Control Size Ladder, el número de reacciones (**m**) es:

m = núm. de muestras	(analice cada muestra una sola vez)
+ 1	ADN de control negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	Control sin molde (agua)
+ 1	Para corregir errores de pipeteo
m = núm. de muestras + 3	**Total**

- Por lo tanto, el volumen total de la parte de la mezcla maestra Specimen Control Size Ladder es **m × 45 µL**.

7.3.3. **Para los *TCRB* Tubes A y B:** Añada 2,25 unidades (o 0,45 µL a 5 U/µL) de ADN polimerasa Taq por reacción a cada mezcla maestra.

- La ADN polimerasa Taq añadida a cada mezcla maestra es **m × 0,45 µL**.
- Mezcle suavemente en el agitador vorticial.

7.3.4. **Para el *TCRB* Tube C y los *TCRG* Tubes A y B y la Specimen Control Size Ladder:** añada 1,25 unidades (o 0,25 µL a 5 U/µL) de ADN polimerasa Taq por reacción a cada mezcla maestra.

- La ADN polimerasa Taq total pipeteada a cada mezcla maestra es **n × 0,25 µL** para la mezcla maestra del *TCRB* Tube C y **m × 0,25 µL** para la mezcla maestra Specimen Control Size Ladder.
- Mezcle suavemente en el agitador vorticial.

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

7.3.6. Añada 5 µL del molde que corresponda (ADN de muestra, ADN de control positivo, ADN de control negativo o agua) a los pocillos individuales que contengan las mezclas maestras. Pipetee arriba y abajo varias veces para mezclar.

7.3.7. Tape o cubra la placa para PCR.

- Las muestras estarán listas para su amplificación en un termociclador.
- Si la amplificación no puede realizarse inmediatamente después de preparar el reactivo, las placas o tubos para PCR pueden conservarse a entre 2°C y 8°C durante 24 horas como máximo.

Guía rápida

Por cada mezcla maestra y n de reacciones, mezcle:

n 45 µL	Mezcla maestra
n × 0,25 µL o 0,45 µL*	ADN polimerasa Taq

Mezcle suavemente en el agitador vorticial.

Pipetee **45 µL** de la mezcla maestra + la solución de ADN polimerasa Taq en cada pocillo.

Añada **5 µL** del molde que corresponda en cada pocillo.

Volumen total de la reacción = 50 µL

*Nota: Use **0,45 µL** de ADN polimerasa Taq en los *TCRB* Tubes A y B y **0,25 µL** de ADN polimerasa Taq en el *TCRB* Tube C y la Specimen Control Size Ladder.

7.4. Amplificación

7.4.1. Amplifique las muestras siguiendo este programa para PCR:

- Seleccione la opción de medición de la temperatura **indicada** en el termociclador BioRad MJ PTC PTC.

Tabla 5. Condiciones del termociclador

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
1	95°C	7 minutos	1
2	95°C	45 segundos	35
3	60°C	45 segundos	
4	72°C	90 segundos	
5	72°C	10 minutos	1
6	15°C	∞	1

7.4.2. Extraiga la placa o los tubos de amplificación del termociclador.

- Aunque el ADN amplificado sea estable a temperatura ambiente durante largos períodos, conserve los productos de PCR a entre 2°C y 8°C hasta la detección. La detección debe realizarse en los 30 días posteriores a la amplificación.

7.5. Detección por fluorescencia ABI

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

Plataformas ABI 310, 3100 o 3130

7.5.1. Mezcle, en un tubo para microcentrífuga nuevo, la cantidad pertinente (para un total de 10 µL por reacción) de Hi-Di Formamide con los ROX Size Standards. Mezcle bien en el agitador vorticial.
7.5.2. En una placa de 96 pocillos para PCR nueva, vierta 10 µL de la mezcla de Hi-Di Formamide y los ROX Size Standards en un pocillo por PCR.
7.5.3. Pipetee 1 µL de cada reacción a los pocillos que contienen la mezcla de Hi-Di Formamide y los ROX Size Standards. Pipetee una muestra por pocillo. Pipetee arriba y abajo para mezclar.
7.5.4. Tape o cubra la placa o tubos para PCR.
7.5.5. Desnaturalice las muestras a 95°C durante 2 minutos; a continuación, enfríelas en hielo durante 5 minutos.
7.5.6. Prepare una **hoja de muestras** y una **lista de inyección** para las muestras.
7.5.7. Desarrolle las muestras en un equipo de electroforesis capilar ABI de acuerdo con el manual del usuario.

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

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

Plataformas ABI 3500:

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

7.5.9. Mezcle, en un tubo para microcentrífuga nuevo, la cantidad pertinente (9,5 µL por reacción) de Hi-Di Formamide con los LIZ Size Standards. Mezcle bien en el agitador vorticial.
7.5.10. En una placa de 96 pocillos para PCR nueva, vierta 9,5 µL de la mezcla de Hi-Di Formamide y los LIZ Size Standards en un pocillo por PCR.
7.5.11. Pipetee 0,5 µL de cada reacción en los pocillos que contienen la mezcla de Hi-Di Formamide y los LIZ Size Standards. Pipetee una muestra por pocillo. Pipetee arriba y abajo para mezclar.
7.5.12. Tape o cubra la placa para PCR.
7.5.13. Desnaturalice las muestras a 95°C durante 3 minutos; a continuación, enfríelas en hielo durante 5 minutos.
7.5.14. Prepare una hoja de muestras y una lista de inyección para las muestras.
7.5.15. Desarrolle las muestras en un equipo de electroforesis capilar ABI 3500 de acuerdo con el manual del usuario.
7.5.16. Los datos se muestran de forma automática como picos de tamaños y colores específicos. Revise el perfil y los controles y notifique los resultados. (Consulte los apartados 8, *Interpretación de los resultados*, y 10, *Valores previstos*.)

7.6. Control de calidad

Con el kit se suministran controles positivos y negativos (o normales); estos pueden desarrollarse una sola vez cada vez que se realiza la prueba, a fin de garantizar una realización adecuada. También debe desarrollarse un control sin molde (p. ej., agua) para saber si la mezcla maestra se ha contaminado y si existe contaminación cruzada en las reacciones de la PCR por el uso de técnicas inadecuadas. Por otro lado, debe incluirse un control de la solución amortiguadora para garantizar que la solución amortiguadora no esté contaminada. Los valores de los controles positivos figuran en el apartado 10.1, *Tamaño previsto de los productos amplificados*. Invivoscribe ofrece controles adicionales y controles de sensibilidad (diluciones de controles positivos en el control negativo).

7.7. Controles positivos recomendados

Los tamaños indicados para el amplicón se determinaron utilizando una plataforma ABI. Los tamaños del amplicón observados con el instrumento de electroforesis capilar pueden diferir en 1-4 pares de bases (pb) de los indicados, en función de la plataforma de detección y de la versión del software de análisis utilizado. Una vez identificado, el tamaño del amplicón determinado en la plataforma específica será coherente entre desarrollos. La reproducibilidad es extremadamente útil para el control de las recidivas.

Nota: Con “color”, se hace referencia al color de los productos generados con la mezcla maestra cuando se utiliza la asignación de color por defecto en los sistemas de detección por fluorescencia ABI. Los tamaños indicados para el amplicón se determinaron utilizando una plataforma ABI.

Tabla 6. Controles positivos recomendados

Mezcla maestra	Diana	Color	ADN de control	Número de catálogo	Tamaño del producto (pb)
TCRG Tube A	Vβ + Jβ1/2	Azul (Jβ2.X) + Verde (Jβ1.X)	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0009 Clonal Control DNA	--- 40880490	**240-285** 264
TCRB Tube B	Vβ + Jβ2	Azul (Jβ2.X)	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0004 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40880190 40881210	**240-285** 253 267
TCRB Tube C	Dβ + Jβ1/2	Azul (Jβ2.X) + Verde (Jβ1.X)	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0009 Clonal Control DNA	--- 40880490	**170-210 (Dβ2), 285-325 (Dβ1)** 309
TCRG Tube A	Vγ1-8 + Vγ10 + múltiples regiones Jγ	Azul (Jγ 1.1/2.1) + Verde (Jγ 1.3/2.3)	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40881210	**145-255** 211 (Vγ1-8 + Jγ1.3/2.3)
TCRG Tube B	Vγ9 Vγ11 + múltiples regiones Jγ	Azul (Jγ 1.1/2.1) + Verde (Jγ 1.3/2.3)	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40881210	**80-220** 167 (Vγ9 + Jγ1.3/2.3)
Specimen Control Size Ladder	Distintos genes	Azul	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	**96, 197, 297, 397, 602**[a] 96, 197, 297, 397, 602[a]

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

8. Interpretación de los resultados

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

8.1. Análisis

8.1.1. Indique lo siguiente para las muestras que no consiga amplificar tras repetir el análisis: “Se desconoce la naturaleza de la muestra porque la cantidad o la calidad del ADN eran insuficientes para su análisis”.

8.1.2. Repita el análisis de las muestras que den negativo si falló la reacción del control positivo.

8.1.3. Si las muestras desarrolladas por duplicado arrojan resultados incompatibles, realice un nuevo análisis o una nueva evaluación de las muestras.

8.1.4. Deben examinarse todos los controles antes de interpretar los resultados de las muestras.

Tabla 7. A continuación, se describe el análisis de cada uno de los controles, así como las decisiones que deben tomarse en función de los resultados.

Tipo de control	Resultado previsto	Resultado anómalo
Control sin molde	Ausencia de amplificación: continúe con el análisis.	Presencia de amplificación. Repita la prueba.
Control policlonal	El tamaño del producto es coherente con el tamaño previsto en el apartado 10.1, *Tamaño previsto de los productos amplificados*. Ausencia de reordenamientos clonales. Continúe con el análisis.	Presencia de reordenamientos clonales. Repita la prueba.
Control positivo (puede usarse un control de extracción si el material de referencia positivo abarca procesos de extracción)	El tamaño del producto es coherente con el tamaño previsto en el apartado 10.1, *Tamaño previsto de los productos amplificados*. Continúe con el análisis.	El producto no se ajusta al intervalo de tamaños válidos. Repita la prueba.
Specimen Control Size Ladder (este control de la amplificación es fundamental para muestras de cantidad y calidad desconocidas)	Si se observan picos de 96, 197, 297, 397 y 602 pb, continúe con el análisis. Debido a que los fragmentos de PCR más pequeños se amplifican de manera preferente, no es extraño que el fragmento de 600 pb tenga una menor señal o que esté completamente ausente. Continúe con el análisis.	Si no se observan bandas, repita la prueba, a menos que la muestra arroje un resultado positivo. Si solo se observan 1, 2 o 3 bandas, vuelva a evaluar la muestra para comprobar la presencia de degradación del ADN, a menos que la muestra arroje un resultado positivo.

8.2. Interpretación de la muestra

Si los controles arrojan los resultados previstos, interprete las muestras clínicas del siguiente modo:

- Si se observan una o dos bandas positivas prominentes[a] que se ajusten al intervalo de tamaños válidos, debe notificarse lo siguiente:
  "**Positivo para la detección de reordenamientos génicos del receptor de linfocitos T de las cadenas beta o gamma coherente con la presencia de una población de células clonales. De acuerdo con los criterios diagnósticos generales, las poblaciones de células clonales pueden ser indicativas de neoplasias hemáticas**".
- Si no se observan bandas positivas[a] que se ajusten al intervalo de tamaños válidos, debe notificarse lo siguiente:
  "**Negativo para la detección de reordenamientos génicos del receptor de linfocitos T de las cadenas beta o gamma**".

[a]Nota: **Los criterios para definir una banda positiva son los siguientes:**

- Son picos positivos aquellos derivados de productos generados a partir de **muestras diagnósticas** que se ajustan al intervalo de tamaños válidos y presentan un tamaño al menos tres veces superior al tercer pico de mayor tamaño del fondo policlonal.
- Son picos positivos aquellos derivados de productos generados a partir de **muestras recogidas tras el diagnóstico inicial**, se ajustan al intervalo de tamaños válidos y 1) presentan un tamaño al menos tres veces superior al tercer pico de mayor tamaño, y 2) son mayores que los picos adyacentes e idénticos en tamaño a los productos de los amplicones clonales generados con las muestras del mismo paciente y la misma mezcla maestra. Son bandas positivas aquellas derivadas de muestras que se ajusten al intervalo de tamaños válidos y generen bandas discretas diferenciadas de cualquier fondo.

9. Limitaciones del procedimiento

- Este kit de prueba no identifica el 100 % de las poblaciones de células clonales.
- La prueba no es capaz de detectar de manera fiable menos de 1 célula positiva por cada 100 células normales.
- Los resultados de las pruebas de clonalidad molecular siempre deben interpretarse en el contexto de los datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos disponibles.
- Las pruebas de tipo PCR están sujetas a interferencia por degradación del ADN o inhibición de la PCR por EDTA, heparina y otros compuestos.

10. Valores previstos

10.1. Tamaño previsto de los productos amplificados

Los tamaños indicados para el amplicón se determinaron utilizando una plataforma ABI. Los tamaños del amplicón observados con el instrumento de electroforesis capilar pueden diferir en 1-4 pares de bases (pb) de los indicados, en función de la plataforma de detección y de la versión del software de análisis utilizado. Una vez identificado, el tamaño del amplicón determinado en la plataforma específica será coherente entre desarrollos. La reproducibilidad es extremadamente útil para el control de las recidivas.

Nota: Con "color", se hace referencia al color de los productos generados con la mezcla maestra cuando se utiliza la asignación de color por defecto en los sistemas de detección por fluorescencia ABI. Los tamaños indicados para el amplicón se determinaron utilizando una plataforma ABI.

Tabla 8. Tamaños previstos de los productos amplificados

Mezcla maestra	Diana	Color	ADN de control	Número de catálogo	Tamaño de producto (pb)
TCRB Tube A	Vβ + Jβ1/2	Azul (Jβ2.X) + Verde (Jβ1.X)	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0009 Clonal Control DNA IVS-0004 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880490 40880190	**240-285** 240-285, 271[a] 264 295
TCRB Tube B	Vβ + Jβ2	Azul (Jβ2.X)	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0009 Clonal Control DNA IVS-0004 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880490 40880190 40881210	**240-285** 240-285, 221[b] --- 253 267

Tabla 8. Tamaños previstos de los productos amplificados

Mezcla maestra	Diana	Color	ADN de control	Número de catálogo	Tamaño de producto (pb)
TCRB Tube C	Dβ + Jβ1/2	Azul (Jβ2.X) + Verde (Jβ1.X)	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0009 Clonal Control DNA IVS-0004 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880490 40880190	**170-210 (Dβ2), 285-325 (Dβ1)** 128[b], 170-210, 285-325, 337[b] 309 295
TCRG Tube A	Vγ1-8, Vγ10 + múltiples regiones Jγ	Azul (Jγ 1.1/2.1) + Verde (Jγ 1.3/2.3)	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0009 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880490 40881210	**145-255** **230-255** (Vγ1-8 + Jγ 1.1/2.1), **195-230** (Vγ1-8 + Jγ 1.3/2.3), **175-195** (Vγ10 + Jγ 1.1/2.1), **145-175** (Vγ10 + Jγ 1.3/2.3) 212 (Vγ1-8 + Jγ 1.3/2.3) 211 (Vγ1-8 + Jγ 1.3/2.3)
TCRG Tube B	Vγ9 Vγ11 + múltiples regiones Jγ	Azul (Jγ 1.1/2.1) + Verde (Jγ 1.3/2.3)	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0009 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880490 40881210	**80-220** **195-220** (Vγ9 + Jγ 1.1/2.1), **160-195**[c] (Vγ9 + Jγ 1.3/2.3), **110-140**[d] (Vγ11 + Jγ 1.1/2.1), **80-110**[d] (Vγ11 + Jγ 1.3/2.3) 115[e] (Vγ11 + Jγ 1.3/2.3) 167 (Vγ9 + Jγ 1.3/2.3)
Specimen Control Size Ladder	Distintos genes	Azul	**Intervalo de tamaños válidos** IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	**96, 197, 297, 397, 602**[f] 96, 197, 297, 397, 602[f]

[a]Nota: La banda de 271 pb se observa especialmente en muestras con una cantidad de células linfoides contaminantes baja.
[b]Nota: En condiciones subóptimas, pueden detectarse productos inespecíficos de 221 pb (en el Tubo B) y de 128 y 337 pb (en el Tubo C). Si se detectan, estas bandas no suelen ser importantes.
[c]Nota: Dado que los fragmentos de PCR más pequeños se amplifican de manera preferente, no es extraño que el fragmento de 602 pb presente una menor señal o esté completamente ausente.
[d]Nota: No suelen observarse amplicones en este intervalo de tamaños. Se trata de un repertorio extremadamente restringido.
[e]Nota: Este podría observarse como amplicón débil.
[f]Nota: Dado que los fragmentos de PCR más pequeños se amplifican de manera preferente, no es extraño que el fragmento de 602 pb presente una menor señal o esté completamente ausente.

10.2. Datos de la muestra

Los datos que se muestran en las figuras 2-7 se generaron utilizando las mezclas maestras indicadas. Los productos amplificados se desarrollaron en un instrumento ABI.

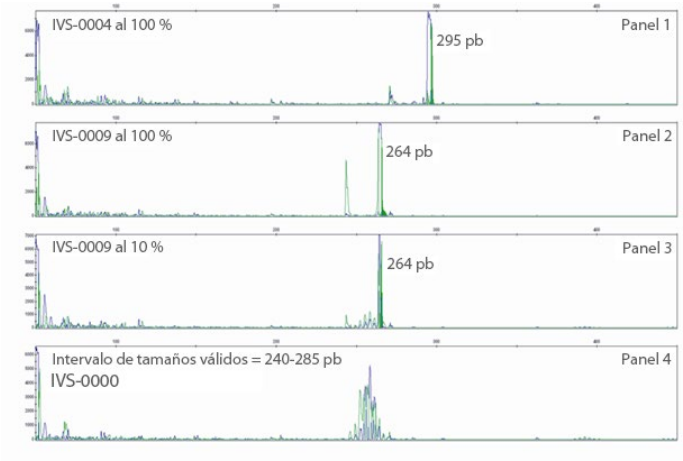

Figura 2. *TCRB* Tube A – 6FAM & HEX

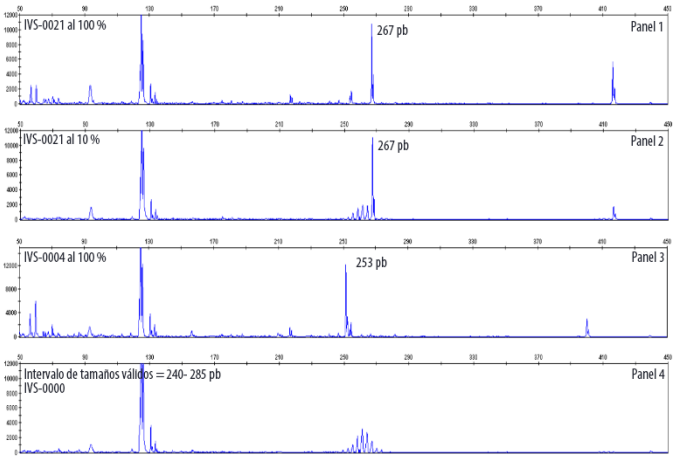

Figura 3. *TCRB* Tube B – 6FAM

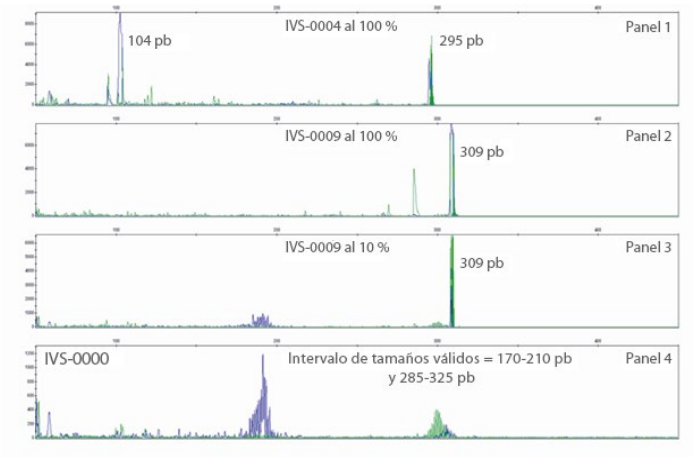

Figura 4 *TCRB* Tube C – 6FAM & HEX

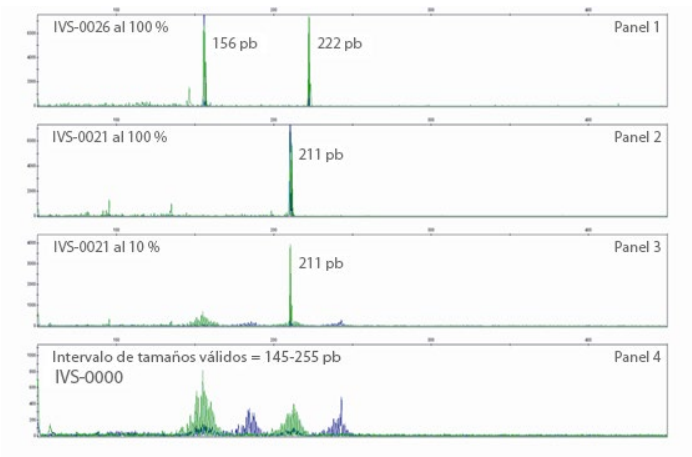

Figura 5 *TCRG* Tube A – 6FAM & HEX

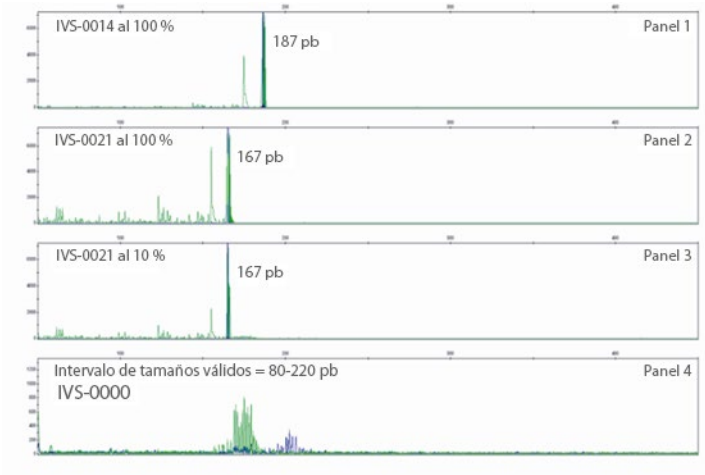

Figura 6 *TCRG* Tube B – 6FAM & HEX

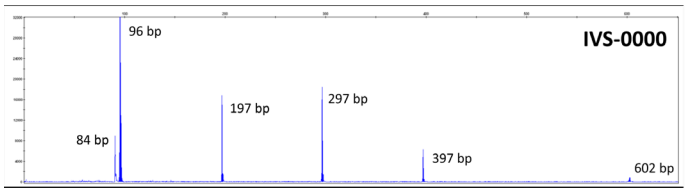

Figura 7 Specimen Control Size Ladder – 6FAM master mix

11. Eficacia diagnóstica

La IdentiClone *TCRB* + *TCRG* T-cell Clonality PCR es una prueba por PCR rápida y fiable, mucho más sensible que la técnica de Southern (SB) para la detección de clonalidad en casos de sospecha de trastornos linfoproliferativos. El diagnóstico clínico e histopatológico final se correlaciona bien con los resultados de la PCR en un gran número de pacientes frente a los resultados de la técnica de SB. Esto figura en dos importantes artículos; uno lo publicaron van Dongen y cols. en 2003 en *Leukemia* y el otro lo publicaron Sandberg y cols. en 2005 en la *Journal of Molecular Diagnostics* (JMD).

Tabla 9. Comparación de la detección mediante PCR y Southern (SB)

Concordancia PCR-SB (*Leukemia*)[2]		Concordancia PCR-SB (*JMD*)[3]	
IGH	Sensibilidad del 93 % y especificidad del 92 %	*IGH* + *IGK*:	Sensibilidad del 85 %
IGK	Sensibilidad del 90 % y especificidad del 90 %		
IGL	Sensibilidad del 86 % y especificidad del 92 %		
TCRB	Sensibilidad del 86 % y especificidad del 98 %	*TCRB*:	Sensibilidad del 85 %
TCRG	Sensibilidad del 89 % y especificidad del 94 %		
TCRD	Sensibilidad del 83 % y especificidad del 95 %		

Tabla 10. Análisis mediante PCR frente a SB en relación con el estudio histopatológico y el diagnóstico final

	Concordancia PCR-SB	Sensibilidad de la PCR	Sensibilidad de la SB
IGH + IGK	85 %	98 %	39 %
TCRB	85 %	96 %	35 %

El estudio de Sandberg y cols. fue un estudio independiente de 300 muestras de distintos tipos. En los casos en los que se realizaron análisis tanto por PCR como por SB, cuyos resultados pudieron correlacionarse con los estudios histopatológicos y el diagnóstico final, se determinó que la eficacia diagnóstica de las pruebas IdentiClone fue de al menos un 96 %. Estas son, por consiguiente, mucho más precisas que las pruebas basadas en SB, que en este estudio pasaron por alto 23 casos evidentes de neoplasias y 7 casos de posibles neoplasias. Las pruebas IdentiClone no generaron resultados falsos positivos y tuvieron un nivel de precisión elevado.[3] Un beneficio evidente de esta prueba fue que los resultados permitieron la detección posterior de reordenamientos génicos específicos en los pacientes y en los tumores por lo que respecta a la detección de enfermedad mínima residual.

12. Servicio técnico y atención al cliente

Los agentes de servicio técnico y de atención al cliente están disponibles de lunes a viernes para responder a sus preguntas por teléfono, correo electrónico o web.

Datos de Contacto

Invivoscribe, Inc
10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | Estados Unidos
Téléfono: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Horario comercial: De 07:00 a 17:00 PST/PDT
Servicio técnico: support@invivoscribe.com | Atención al cliente: sales@invivoscribe.com | Sitio web: www.invivoscribe.com

13. Bibliografía

1. Miller, J. E.; Wilson, S.S.; Jaye, D.J.; Kronenberg, M. (1999): An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Molecular Diagnostics* 4, 101-117.
2. Van Dongen, J. J. M. *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, J. H. J. M. *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.

14. Símbolos

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

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

15. Aviso legal

15.1. Garantía y responsabilidad

Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) se compromete a suministrar productos de primera calidad. Invivoscribe® garantiza que sus productos cumplen e incluso superan los criterios de rendimiento descritos en las Instrucciones de uso por lo que respecta a los productos cubiertos. Si alguno de los productos no funciona de acuerdo con las especificaciones indicadas para el producto en cuestión, nuestra política es reemplazar el producto o abonar el precio total de compra. Invivoscribe® no ofrece ninguna otra garantía, explícita o implícita. La responsabilidad de Invivoscribe® se limita al precio de compra del producto. Invivoscribe no se responsabilizará de daños directos, indirectos, consecuentes o accidentales derivados del uso, los resultados del uso o la imposibilidad de usar sus productos. Debe establecerse y controlarse continuamente la eficacia del producto en condiciones controladas por el comprador y en su laboratorio a través de procesos definidos y controlados por el comprador, entre los que se incluyen las pruebas con controles positivos, negativos y sin molde cada vez que se analiza una muestra. El pedido, la aceptación y el uso del producto constituyen la aceptación por parte del comprador de la responsabilidad exclusiva de garantizar la eficacia del producto y el acuerdo del comprador con la limitación de la responsabilidad.

Este es un producto de diagnóstico *in vitro* que no está disponible para su venta o uso en Norteamérica.

15.2. Patentes y marcas registradas

Este producto está cubierto por una o más de las siguientes: patente europea número 1549764, patente europea número 2418287, patente europea número 2460889, patente japonesa número 4708029, patente de estadounidense número 8859748. Solicitudes pendientes y futuras relacionadas. Todas estas patentes y solicitudes se limitan únicamente a Invivoscribe®. También son aplicables patentes adicionales cuyo uso se ha autorizado a Invivoscribe. Muchos de estos productos implican el uso de métodos de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante la compra de este producto no se transmite de manera explícita ni implícita ninguna de las licencias de uso de estas patentes sobre enzimas o procesos de amplificación.

Identiclone® es una marca comercial registrada de Invivoscribe®.

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