

Istruzioni per l'uso

CE UK
CA IVD

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

Per l'identificazione dei riarrangiamenti clonali dei geni codificanti per le catene beta e gamma del recettore dei linfociti T.

IVD Per uso diagnostico *in vitro*



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

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

N. di catalogo	Prodotti	Quantità
REF 9200011	IdentiClone <i>TCRB</i> + <i>TCRG</i> T-cell Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 reazioni
REF 9200021	IdentiClone <i>TCRB</i> + <i>TCRG</i> T-cell Clonality 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	4
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	9
7.1.	Materiali forniti.....	9
7.2.	Materiali necessari (non forniti)	9
7.3.	Preparazione dei reagenti	10
7.4.	Amplificazione.....	11
7.5.	Rilevamento della fluorescenza ABI	11
7.6.	Controllo di qualità	12
7.7.	Controlli positivi raccomandati	13
8.	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI.....	13
8.1.	Analisi.....	13
8.2.	Interpretazione del campione	14
9.	LIMITI DELLA PROCEDURA	14
10.	VALORI ATTESI.....	15
10.1.	Dimensioni attese dei prodotti amplificati.....	15
10.2.	Dati del campione	16
11.	CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI	17
12.	ASSISTENZA TECNICA E SERVIZIO CLIENTI.....	17
13.	BIBLIOGRAFIA	17
14.	SIMBOLI	18
15.	AVVISO LEGALE	18
15.1.	Garanzia e dichiarazione di responsabilità.....	18
15.2.	Brevetti e marchi commerciali.....	18

1. Destinazione d'uso

IdentiClone *TCRB + TCRG* T-cell Clonality Assay è un prodotto per la diagnostica *in vitro* ideato per il rilevamento, basato su PCR, dei riarrangiamenti clonali dei geni codificanti per le catene beta e gamma del recettore dei linfociti T in pazienti con sospette linfoproliferazioni. In particolare, *TCRB + TCRG* T-cell Clonality Assay può essere utilizzato per:

- determinare la clonalità nelle linfoproliferazioni sospette
- supportare la diagnosi differenziale tra lesioni reattive e neoplasie maligne che coinvolgono i linfociti T e alcuni linfociti B immaturi
- determinare il coinvolgimento della linea cellulare nei disturbi linfoproliferativi a cellule mature
- monitorare e valutare la recidiva 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 i riarrangiamenti unici dei geni V-J presenti all'interno di questi loci del recettore antigenico.¹ Il saggio PCR di IdentiClone impiega primer multipli di DNA consensus che identificano regioni genetiche conservate all'interno dei geni codificanti per le catene beta e gamma del recettore dei linfociti T. Questo test viene utilizzato per rilevare la maggior parte delle neoplasie clonali dei linfociti T a partire dal DNA. I prodotti del test possono essere analizzati usando vari sistemi di rilevamento, compresa l'elettroforesi su gel e capillare.

Le analisi dei riarrangiamenti genici si possono effettuare anche mediante tecniche di Southern blot (SB). Anche se l'analisi SB è molto affidabile, ad essa vengono preferite sempre più spesso tecniche di PCR a causa della maggiore efficienza e sensibilità della PCR. Inoltre, la PCR è relativamente facile, meno laboriosa e richiede quantità molto inferiori di DNA ad alto peso molecolare rispetto ai test SB. In più la PCR può essere eseguita sul DNA estratto da campioni di tessuto inclusi in paraffina, mentre il SB non può essere eseguito perché il DNA è spesso degradato. Pertanto, sussiste una forte necessità di sostituire l'analisi SB con tecniche di PCR affidabili.

2.2. Sommario

I saggi IdentiClone di Invivoscribe rappresentano un nuovo approccio alle analisi di clonalità basate su PCR. Queste analisi standardizzate sono state ottimizzate accuratamente mediante test su campioni di controllo positivi e negativi, utilizzando master mix multiplex. Allo sviluppo dei test è seguita la convalida esaustiva che ha incluso l'analisi di oltre 400 campioni clinici usando la classificazione Revised European/American Lymphoma (REAL). Le prove sono state eseguite in oltre trenta centri di test indipendenti all'avanguardia in tutta Europa, in uno studio collaborativo chiamato BIOMED-2 Concerted Action. I risultati di questo studio BIOMED-2 sono stati pubblicati sull'importante rivista *Leukemia*, sottoposta a peer-review². Secondo un articolo di *Leukemia* del 2007, l'analisi di entrambi i riarrangiamenti genici di *TCRB* e *TCRG* ha prodotto una sensibilità del 94%, rispetto al 91% per *TCRB* e all'89% per *TCRG* analizzati singolarmente. Potrebbe anche aumentare l'affidabilità dei test poiché è più probabile che i prodotti clonali siano rilevati in più di una provetta.⁴

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

Questo kit del test comprende 6 master mix. Le master mix *TCRB* Tubes A and B (*TCRB* Provette A e B) identificano le regioni framework all'interno della regione variabile e di giunzione del locus della catena beta *TCR*. La master mix *TCRB* Tube C (*TCRB* Provetta C) identifica le regioni di diversità e di giunzione del locus della catena beta *TCR*. La master mix *TCRG* Tube A (*TCRG* Provetta A) contiene i primer che identificano i geni *Vγ1-8 + Vγ10* e i geni *Jγ1.1, Jγ1.3, Jγ2.1* e *Jγ2.3* (detti anche *JγP1, Jγ1, JγP2* e *Jγ2* rispettivamente). La master mix *TCRG* Tube B (*TCRG* Provetta B) contiene i primer che identificano i geni *Vγ9 + Vγ11* e i geni *Jγ1.1, Jγ1.3, Jγ2.1* e *Jγ2.3*. Infine, la master mix Specimen Control Size Ladder (Marcatore di dimensione per il controllo del campione) identifica vari geni e genera una serie di ampliconi di circa 96, 197, 197, 397 e 602 coppie di basi per garantire che la qualità e la quantità di DNA iniziale sia adeguata per produrre un risultato valido. Un singolo programma del termociclatore e metodiche di indagine simili vengono utilizzati con tutti i nostri saggi di clonalità genica. Ciò migliora la coerenza e facilita l'utilizzo combinato di una vasta gamma di saggi differenti.

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



3. Principi della procedura

3.1. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

I saggi PCR sono utilizzati abitualmente per l'identificazione di popolazioni clonali di linfociti T. Questi test amplificano il DNA tra i primer che identificano le regioni conservate variabili (V) e le regioni conservate di giunzione (J) (*TCRB* Tubes A & B [*TCRB* Provette A e B] e *TCRG* Tubes A & B [*TCRG* Provette A e B]), oltre alle regioni di diversità (D) e di giunzione (*TCRB* Tube C [*TCRB* Provetta C]). Queste regioni conservate si trovano su entrambi i lati di un'area all'interno della regione V-J in cui si verificano riarrangiamenti genici programmati durante la maturazione di tutti i linfociti B e T. I geni dei recettori antigenici che subiscono il riarrangiamento sono la catena pesante e le catene leggere delle immunoglobuline nei linfociti B e i geni del recettore dei linfociti T nelle cellule T. Ciascun linfocito 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 produce una curva a campana (distribuzione gaussiana) di ampliconi all'interno di un intervallo di dimensioni atteso. 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.

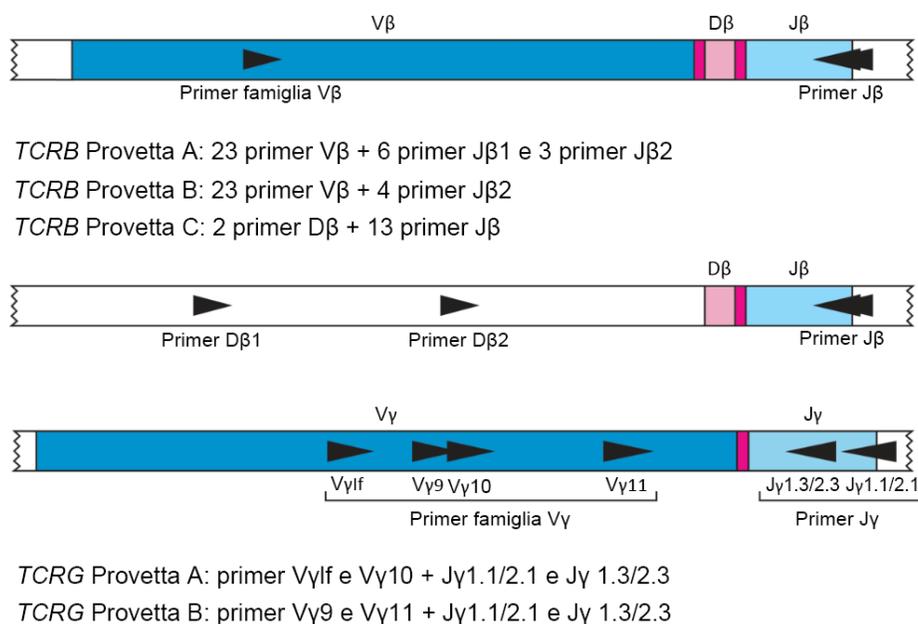


Figura 1. Questo è un grafico semplificato rappresentativo di un gene riarrangiato per la catena beta e un gene riarrangiato per la catena gamma del recettore dei linfociti T, in cui si mostra la posizione approssimativa dei primer sul DNA a monte e a valle. Sono elencati il numero dei primer e la loro specificità per le master mix *TCRB* Provette A, B e C e *TCRG* Provette A e B. (Il primer V γ 1f è un primer consensus che identifica da V γ 1 a V γ 8).

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.

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 coppie di basi. 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.

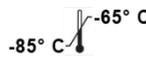
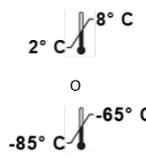
4. Reagenti

4.1. Componenti del reagente

Tabella 1. Kit disponibili

N. di catalogo	Prodotto	Quantità
REF 92000011	IdentiClone <i>TCRB + TCRG</i> T-cell Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 reazioni
REF 92000021	IdentiClone <i>TCRB + TCRG</i> T-cell Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 reazioni

Tabella 2. Componenti del reagente

Reagente	N. di catalogo	Componenti del reagente (ingredienti attivi)	Quantità unitaria	92000011 N. di unità	92000021 N. di unità	Temp. di conservazione
Master mix	22050011CE	TCRB Tube A – 6FAM & HEX Oligonucleotidi multipli per le regioni target $V\beta + J\beta 1 + J\beta 2$ del gene della catena beta del recettore delle cellule T in tampone salino.	1500 μ L	1	10	
	22050021CE	TCRB Tube B – 6FAM Oligonucleotidi multipli per le regioni target $V\beta + J\beta 2$ del gene della catena beta del recettore delle cellule T in tampone salino.	1500 μ L	1	10	
	22050031CE	TCRB Tube C - 6FAM & HEX Oligonucleotidi multipli per le regioni target $D\beta + J\beta 1 + J\beta 2$ del gene della catena beta del recettore delle cellule T in tampone salino.	1500 μ L	1	10	
	22070031CE	TCRG Tube A – 6FAM & HEX Oligonucleotidi multipli per le regioni target $V\gamma 1-8, V\gamma 10$ + regioni $J\gamma$ multiple del gene della catena gamma del recettore delle cellule T in tampone salino.	1500 μ L	1	10	
	22070041CE	TCRG Tube B – 6FAM & HEX Oligonucleotidi multipli per le regioni target $V\gamma 9, V\gamma 11$ + regioni $J\gamma$ multiple del gene della catena gamma del recettore delle cellule T in tampone salino.	1500 μ L	1	10	
Master mix di controllo amplificazione templatato	20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM Oligonucleotidi multipli per geni housekeeping target.	1500 μ L	1	10	
DNA di controllo positivo	40881210	IVS-0021 Clonal Control DNA 200 μ g/mL di DNA in soluzione TE 1/10	100 μ L	1	5	
	40880490	IVS-0009 Clonal Control DNA 200 μ g/mL di DNA in soluzione TE 1/10	100 μ L	1	5	
	40880190	IVS-0004 Clonal Control DNA 200 μ g/mL di DNA in soluzione TE 1/10	100 μ L	1	5	
DNA di controllo negativo (normale)	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA 200 μ g/mL di DNA in soluzione TE 1/10	100 μ L	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 unico 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. Accertarsi di utilizzare il programma del termociclatore corretto, 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.
- Il personale di laboratorio deve 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 nelle distinte aree del laboratorio di PCR deve essere unidirezionale: iniziare con la preparazione della master mix, passare alla preparazione del campione, quindi all'amplificazione e infine al rilevamento. Non portare il DNA amplificato nelle aree destinate alla preparazione della master mix o dei campioni.
- Tutte le pipette, i puntali delle pipette e qualsiasi apparecchiatura utilizzata in una determinata area devono essere dedicati a quella zona del laboratorio.
- Quando possibile, utilizzare materiale da laboratorio in plastica sterile monouso per evitare la contaminazione con RNasi e DNasi o la contaminazione crociata.

4.3. Conservazione e manipolazione

- Se non utilizzati immediatamente, i kit devono essere conservati a una temperatura compresa tra -85°C e -65°C.
- La temperatura di conservazione ottimale per i controlli di DNA è compresa tra 2°C e 8°C, ma 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/scongelo. 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
- Strumento consigliato: termociclatore Veriti™ o equivalente
- Caratteristiche prestazionali e specifiche:
 - Intervallo termico minimo: da 15°C a 96°C
 - Velocità di rampa minima: 0,8°C/s
- Seguire le procedure di installazione, utilizzo, calibrazione e manutenzione del produttore.
- 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 ABI 310, 1 capillare)
 - ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (4-capillaries) (Analizzatore genetico Avant ABI 3100, 4 capillari)
 - ABI 3100 Genetic Analyzer (16-capillaries) (Analizzatore genetico ABI 3100, 16 capillari)
 - ABI 3130 Genetic Analyzer (4-capillaries) (Analizzatore genetico ABI 3130, 4 capillari)
 - ABI 3130xL Genetic Analyzer (16-capillaries) (Analizzatore genetico ABI 3130xL, 16 capillari)
 - ABI 3500 Genetic Analyzer (8-capillaries) (Analizzatore genetico ABI 3500, 8 capillari)
 - ABI 3500xL Genetic Analyzer (24-capillaries) (Analizzatore genetico ABI 3500xL, 24 capillari)
- Seguire le procedure di installazione, utilizzo, calibrazione e manutenzione del produttore.
- Lo strumento ABI utilizzato deve essere calibrato con i riferimenti per la matrice appropriati, come indicato nella sezione 7.2 *Materiali necessari (non forniti)*.
- Utilizzare le impostazioni predefinite per il proprio polimero e tipo di capillare.
- Vedere la sezione 7.5 *Rilevamento della fluorescenza ABI*.

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)
- 300 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. Materiali forniti

N. di catalogo	Descrizione
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. Materiali necessari (non forniti)

Tabella 4. Materiali necessari (non forniti)

Reagente/Materiale	Reagenti/Materiali consigliati e produttori	N. di catalogo	Note
DNA polimerasi	Roche: • DNA polimerasi EagleTaq Invivoscribe: • DNA polimerasi FalconTaq o equivalente	05206944190 60970130	N/A
Acqua distillata in vetro, deionizzata per biologia molecolare o acqua purificata per uso farmaceutico	N/A	N/A	Senza DNasi/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: • Termociclatore Veriti Dx 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	Thermo Fisher Scientific: • ABI serie 310, 3100 o 3500	N/A	N/A
Formammide Hi-Di	Thermo Fisher Scientific: • Hi-Di™ Formamide	4311320	N/A
Standard di riferimento	Invivoscribe: • Hi-Di Formamide con standard di riferimento ROX per ABI 3100 Thermo Fisher Scientific: • Per strumenti ABI 3100 o 3130: ▪ GeneScan™ - 400HD [ROX]™ • Per strumenti ABI 3500: ▪ GeneScan - 600 [LIZ]™ v 2.0	60980061 402985 4408399	N/A

Tabella 4. Materiali necessari (non forniti)

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

7.3. Preparazione dei reagenti

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

7.3.1. 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 LING: 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.
- 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 (vedi Tabella 6)
+ 1	DNA di controllo negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	controllo senza templat
+ 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 singolarmente)
+ 1	DNA di controllo negativo (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	controllo senza templat (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. **Per TCRB Tubes A e B:** aggiungere 2,25 U (o 0,45 µL a 5 U/µL) di DNA polimerasi Taq per reazione a ciascuna master mix.

- Il totale di DNA polimerasi Taq aggiunto a ciascuna master mix è **n × 0,45 µL**.
 - Mescolare delicatamente mediante vortex.
- 7.3.4. **Per TCRB Tube C e TCRG Tubes A e B e Specimen Control Size Ladder:** aggiungere 1,25 U (o 0,25 µL a 5 U/µL) di DNA polimerasi Taq per reazione.
- Il totale di DNA polimerasi Taq aggiunto a ciascuna master mix è **n × 0,25 µL** per la master mix TCRB Tube C e **m × 0,25 µL** per la master mix Specimen Control Size Ladder.
 - Mescolare delicatamente mediante vortex.
- 7.3.5. 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.
- 7.3.6. Aggiungere 5 µL di templatato 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.
- 7.3.7. 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 o 0,45 µL*	DNA polimerasi Taq

Mescolare delicatamente mediante vortex.

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

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

Volume reazione totale = 50 µL

***Nota:** utilizzare **0,45 µL** di DNA polimerasi Taq per TCRB Tubes A e B e **0,25 µL** di DNA polimerasi Taq per TCRB Tube C e Specimen Control Size Ladder.

7.4. Amplificazione

- 7.4.1. Amplificare i campioni con il seguente programma di PCR:
- Utilizzare l'opzione **calcolato** per la misura di temperatura con i termociclatori BioRad MJ PTC.

Tabella 5. Condizioni per i cicli termici

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

- 7.4.2. Rimuovere la piastra o le provette di amplificazione dal termociclatore.
- Sebbene il DNA amplificato sia stabile a temperatura ambiente per lunghi periodi di tempo, i prodotti di PCR devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C fino al momento del rilevamento. Il rilevamento 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 a 96 coppie di basi è preceduto da un picco che si manifesta a 84 coppie di basi.

- Non è consigliabile il multiplexing dei prodotti di PCR provenienti da diverse master mix, in quanto riduce la 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 Hi-Di Formamide con ROX Size Standards. Mescolare accuratamente mediante vortex.
- 7.5.2. In una nuova piastra per PCR da 96 pozzetti, aggiungere 10 µL di Hi-Di Formamide con ROX Size Standards in singoli pozzetti per ciascuna reazione.
- 7.5.3. Trasferire 1 µL di ciascuna reazione nei pozzetti contenenti Hi-Di Formamide con ROX Size Standards. Aggiungere un solo campione per pozzetto. Pipettare su e giù per mescolare.
- 7.5.4. Tappare o coprire la piastra o le provette per PCR.
- 7.5.5. Denaturare termicamente i campioni a 95°C per 2 minuti, quindi abbassare rapidamente la temperatura su ghiaccio per 5 minuti.
- 7.5.6. Preparare 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*)

Piattaforme ABI 3500:

Nota: A causa delle variazioni nelle prestazioni tra i diversi strumenti della piattaforma ABI 3500, la quantità di formamide, 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 Hi-Di Formamide con LIZ Size Standards. Mescolare accuratamente mediante vortex.
- 7.5.10. In una nuova piastra per PCR da 96 pozzetti, aggiungere 9,5 µL di Hi-Di Formamide con LIZ Size Standards in singoli pozzetti per ciascuna reazione PCR.
- 7.5.11. Trasferire 0,5 µL di ciascuna reazione nei pozzetti contenenti Hi-Di Formamide con LIZ Size Standards. Aggiungere un solo campione per pozzetto. Pipettare su e giù per mescolare.
- 7.5.12. Tappare o coprire la piastra per PCR.
- 7.5.13. Denaturare termicamente i campioni a 95°C per 3 minuti, quindi abbassare rapidamente la temperatura trasferendoli direttamente su ghiaccio per 5 minuti.
- 7.5.14. Preparare 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.
- 7.5.16. I dati vengono visualizzati automaticamente come picchi di dimensione e colore specifici. Esaminare il profilo e i controlli, elaborare un report dei risultati. (Consultare 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 vengono analizzati in singolo ogni volta che si effettua il saggio per garantire che sia stato eseguito correttamente. Inoltre, è anche incluso un controllo senza template (p. es. acqua) per verificare l'eventuale contaminazione della master mix o la contaminazione crociata delle reazioni PCR, 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 coppie di basi (bp) 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. Le dimensioni degli ampliconi indicate sono state determinate utilizzando una piattaforma ABI.

Tabella 6. Controlli positivi raccomandati

Master mix	Bersaglio	Colore	DNA di controllo	N. di catalogo	Dimensioni del prodotto (bp)
<i>TCRB</i> Tube A	V β + J β 1/2	Blu (J β 2.X) + Verde (J β 1.X)	Range di dimensioni valide IVS-0009 Clonal Control DNA	--- 40880490	240 - 285 264
<i>TCRB</i> Tube B	V β + J β 2	Blu (J β 2.X)	Range di dimensioni valide IVS-0004 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40880190 40881210	240 - 285 253 267
<i>TCRB</i> Tube C	D β + J β 1/2	Blu (J β 2.X) + Verde (J β 1.X)	Range di dimensioni valide IVS-0009 Clonal Control DNA	--- 40880490	170 - 210 (D β 2), 285 - 325 (D β 1) 309
<i>TCRG</i> Tube A	V γ 1-8 + V γ 10 + regioni J γ multiple	Blu (J γ 1.1/2.1) + Verde (J γ 1.3/2.3)	Range di dimensioni valide IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40881210	145 - 255 211 (V γ 1-8 + J γ 1.3/2.3)
<i>TCRG</i> Tube B	V γ 9 V γ 11 + regioni J γ multiple	Blu (J γ 1.1/2.1) + Verde (J γ 1.3/2.3)	Range di dimensioni valide IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40881210	80 - 220 167 (V γ 9 + J γ 1.3/2.3)
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

^aNota: dal momento che vengono preferenzialmente amplificati frammenti di PCR di dimensioni inferiori, non è inconsueto che il frammento di 600 bp presenti un segnale ridotto o che sia del tutto assente.

8. Interpretazione dei risultati

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

8.1. Analisi

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

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

Tipo di controllo	Risultato atteso	Risultato anomalo
Controllo senza template	Nessuna amplificazione presente, continuare con l'analisi.	Amplificazione presente. Ripetere il saggio.
Controllo policlonale	Le dimensioni del prodotto sono coerenti con le dimensioni previste, elencate nella sezione 10.1 <i>Dimensione attesa dei prodotti amplificati</i> . Nessun riarrangiamento clonale presente. Continuare con l'analisi.	Riarrangiamenti clonali presenti. Ripetere il saggio

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

Tipo di controllo	Risultato atteso	Risultato anomalo
Controllo positivo (Può essere anche un controllo di estrazione, se il materiale per il controllo positivo viene prelevato attraverso processi di estrazione)	Le dimensioni del prodotto sono coerenti con le dimensioni previste, elencate nella sezione 10.1 <i>Dimensione attesa dei prodotti amplificati</i> . Continuare con l'analisi.	Il prodotto non rientra nel range di dimensioni valide. Ripetere il saggio.
Specimen Control Size Ladder (Questo controllo di amplificazione è <u>essenziale</u> per i campioni di quantità e qualità sconosciute)	Se sono visibili tutti i picchi di 96, 197, 297, 397 e 602 bp, continuare con l'analisi. Dal momento che vengono preferenzialmente amplificati frammenti di PCR di dimensioni inferiori, non è inconsueto che il frammento di 600 bp presenti un segnale ridotto o che sia del tutto assente. Continuare con l'analisi.	Se non ci sono bande visibili, ripetere il saggio <u>a meno che il campione non risulti positivo</u> . Se sono visibili solo 1, 2 o 3 bande, rivalutare il campione per verificare l'eventuale degradazione del DNA, <u>a meno che il campione non risulti positivo</u> .

8.2. Interpretazione del campione

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

- Una o due bande positive prominenti^a all'interno del range di dimensioni valide vanno riportate come: **"Positivo per il rilevamento di riarrangiamento/i clonale/i dei geni codificanti per le catene beta e gamma del recettore dei linfociti T, coerente con la presenza di una popolazione clonale di cellule."** Nel contesto dei criteri diagnostici complessivi, le popolazioni clonali di cellule possono indicare la presenza di neoplasia ematologica."
- L'assenza di bande positive^a all'interno del range di dimensioni valide va riportata come: **"Negativo per il rilevamento di riarrangiamento/i clonale/i dei geni codificanti per le catene beta e gamma del recettore dei linfociti T."**

^aNota: i criteri per la definizione di una banda positiva 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. I prodotti generati da campioni che rientrano nel range di dimensioni valide e producono una o più bande separate, distinte dallo striscio di fondo, sono coerenti con una banda positiva.

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 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 coppie di basi (bp) 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. Le dimensioni degli ampliconi indicate sono state determinate utilizzando una piattaforma ABI.

Tabella 8. Dimensioni attese dei prodotti amplificati

Master mix	Bersaglio	Colore	DNA di controllo	N. di catalogo	(Dimensioni del prodotto (bp))
TCRB Tube A	V β + J β 1/2	Blu (J β 2.X) + Verde (J β 1.X)	Range di dimensioni valide 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	V β + J β 2	Blu (J β 2.X)	Range di dimensioni valide 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
TCRB Tube C	D β + J β 1/2	Blu (J β 2.X) + Verde (J β 1.X)	Range di dimensioni valide 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	V γ 1-8, V γ 10 + regioni J γ multiple	Blu (J γ 1.1/2.1) + Verde (J γ 1.3/2.3)	Range di dimensioni valide IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0009 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880490 40881210	145 - 255 230 - 255 (V γ 1-8 + J γ 1.1/2.1), 195 - 230 (V γ 1-8 + J γ 1.3/2.3), 175 - 195 (V γ 10 + J γ 1.1/2.1), 145 - 175 (V γ 10 + J γ 1.3/2.3) 212 (V γ 1-8 + J γ 1.3/2.3) 211 (V γ 1-8 + J γ 1.3/2.3)
TCRG Tube B	V γ 9 V γ 11 + regioni J γ multiple	Blu (J γ 1.1/2.1) + Verde (J γ 1.3/2.3)	Range di dimensioni valide IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0009 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880490 40881210	80 - 220 195 - 220 (V γ 9 + J γ 1.1/2.1), 160 - 195^c (V γ 9 + J γ 1.3/2.3), 110 - 140^d (V γ 11 + J γ 1.1/2.1), 80 - 110^d (V γ 11 + J γ 1.3/2.3) 115 ^e (V γ 11 + J γ 1.3/2.3) 167 (V γ 9 + J γ 1.3/2.3)
Specimen Control Size Ladder	Geni multipli	Blu	Range di dimensioni valide IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	96, 197, 297, 397, 602^f 96, 197, 297, 397, 602 ^f

^aNota: la banda 271 bp si osserva particolarmente in campioni con un basso numero di cellule linfoidi contaminanti.

^bNota: in condizioni sub-ottimali, possono essere rilevati prodotti aspecifici di 221 bp (nella Provetta B) e 128 e 337 bp (nella Provetta C). Se presenti, queste bande sono generalmente deboli.

^cNota: dal momento che vengono preferenzialmente amplificati frammenti di PCR di dimensioni inferiori, non è inconsueto che il frammento di 600 bp presenti un segnale ridotto o che sia del tutto assente.

^dNota: spesso non è visibile alcun prodotto di ampliconi all'interno di questo range di dimensioni. Questo è un repertorio estremamente limitato.

^eNota: questo può essere visto come un amplicone debole.

^fNota: dal momento che vengono preferenzialmente amplificati frammenti di PCR di dimensioni inferiori, non è inconsueto che il frammento di 600 bp presenti un segnale ridotto o che sia del tutto assente.

10.2. Dati del campione

I dati mostrati nelle Figure 2-7 sono stati generati utilizzando le master mix indicate. L'analisi dei prodotti amplificati è stata effettuata su uno strumento ABI.

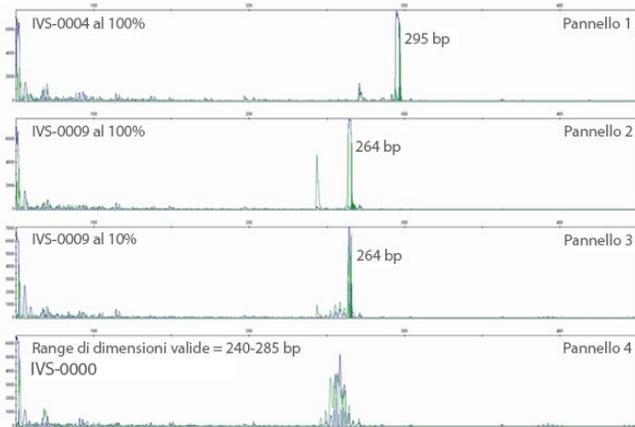


Figura 2. TCRB Tube A – 6FAM & HEX

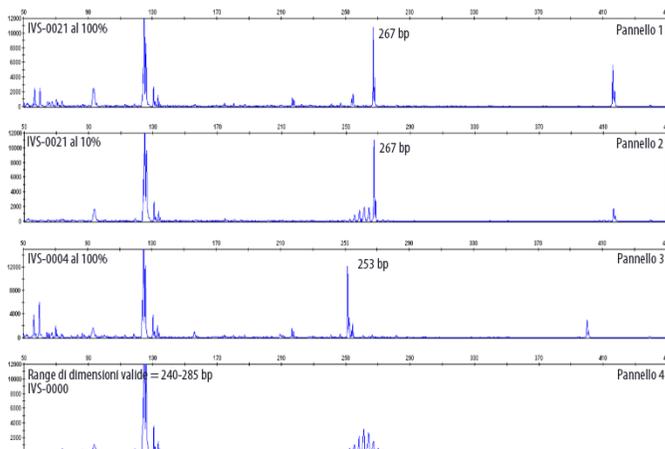


Figura 3. TCRB Tube B – 6FAM

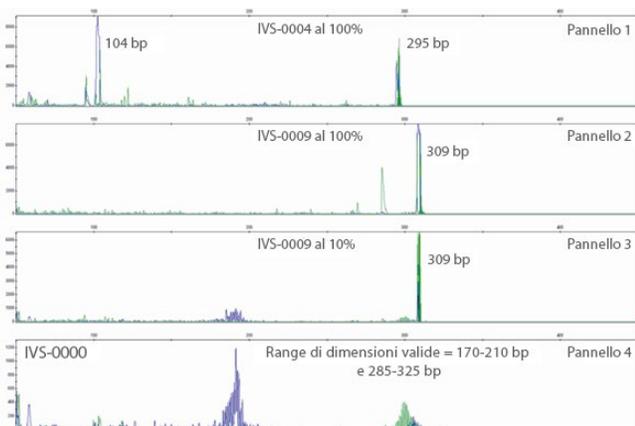


Figura 4 TCRB Tube C – 6FAM & HEX

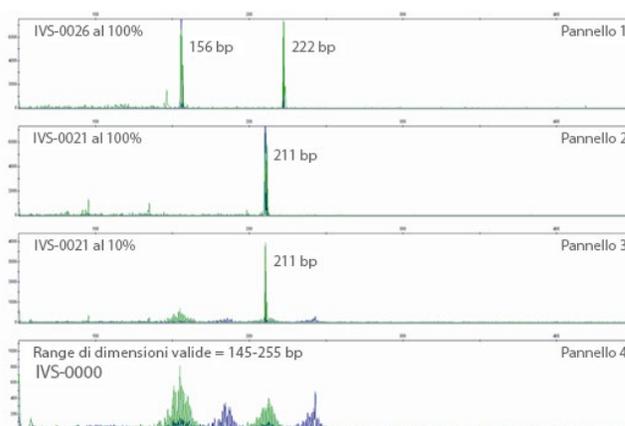


Figura 5 TCRG Tube A – 6FAM & HEX

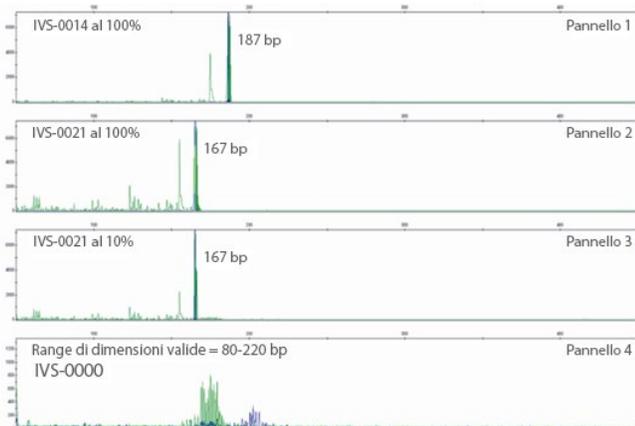


Figura 6 TCRG Tube B – 6FAM & HEX

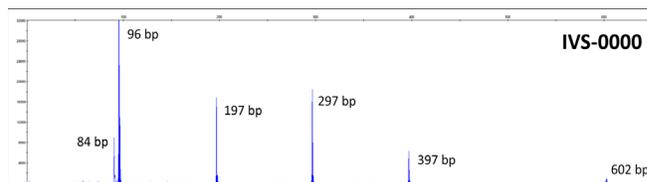


Figura 7 Specimen Control Size Ladder – 6FAM master mix

11. Caratteristiche prestazionali

Il saggio IdentiClone *TCRB + TCRG* T-cell Clonality PCR è una procedura rapida e affidabile che è molto più sensibile rispetto all'analisi Southern Blot (SB) nel rilevamento della clonalità in sospette linfoproliferazioni. La diagnosi clinico-istopatologica finale correla bene con i risultati della PCR in un numero maggiore di pazienti, rispetto ai risultati di SB. Questo è dimostrato da due importanti articoli, uno di van Dongen et al. pubblicato nel 2003 su *Leukemia* e l'altro di Sandberg et al. pubblicato nel 2005 sul *Journal of Molecular Diagnostics* (JMD).

Tabella 9. Confronto tra il rilevamento mediante PCR e Southern blot

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

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

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

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 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. Assistenza tecnica e Servizio clienti

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

Contatti



Invivoscribe, Inc

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

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

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

13. Bibliografia

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

14. Simboli

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

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

15. Avviso legale

15.1. Garanzia e dichiarazione di responsabilità

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

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

15.2. Brevetti e marchi commerciali

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

Identiclone® è un marchio registrato di Invivoscribe®

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