

Istruzioni per l'uso

CE UK  
CA IVD

## IdentiClone® IGL Gene Clonality Assay

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

**IVD** Per uso diagnostico *in vitro*



 invivoscribe®



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
<b>REF</b> 91030011	IdentiClone IGL Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 reazioni
<b>REF</b> 91030021	IdentiClone IGL Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 reazioni

# Indice

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

## 1. Destinazione d'uso

IdentiClone *IGL* Gene Clonality Assay è un prodotto per la diagnostica *in vitro* ideato per il rilevamento, basato su PCR, dei riarrangiamenti clonali dei geni codificanti per la catena leggera lambda delle immunoglobuline in pazienti con sospette linfoproliferazioni. In particolare, *IGL* Gene Clonality Assay può essere utilizzato per:

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

## 2. Sommario e spiegazione del test

### 2.1. Contesto

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

I saggi IdentiClone di Invivoscribe rappresentano un nuovo approccio alle analisi di clonalità basate su PCR. Queste analisi standardizzate sono state ottimizzate accuratamente mediante test su campioni di controllo positivi e negativi, utilizzando master mix multiplex. Allo sviluppo dei test è seguita la convalida esaustiva che ha incluso l'analisi di oltre 400 campioni clinici usando la classificazione Revised European/American Lymphoma (REAL). Le prove sono state eseguite in oltre trenta centri di test indipendenti all'avanguardia in tutta Europa, in uno studio collaborativo chiamato BIOMED-2 Concerted Action.<sup>2</sup>

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

### 2.2. Sommario

Questo kit del test comprende due (2) master mix. La master mix *IGL* Tube (Provetta *IGL*) serve per identificare le regioni target variabile e di giunzione del locus della catena leggera lambda delle immunoglobuline. La master mix Specimen Control Size Ladder (Marcatore di dimensione per il controllo del campione), identifica vari geni e genera una serie di ampliconi di 96, 197, 297, 397 e 602 coppie di basi (bp) per garantire che la qualità e la quantità di DNA iniziale sia adeguata per produrre un risultato valido. Un singolo programma del termociclatore e metodiche di rilevamento simili sono utilizzate per tutti i saggi di clonalità dei geni; ciò migliora la coerenza e facilita l'utilizzo combinato di una vasta gamma di saggi diversi.

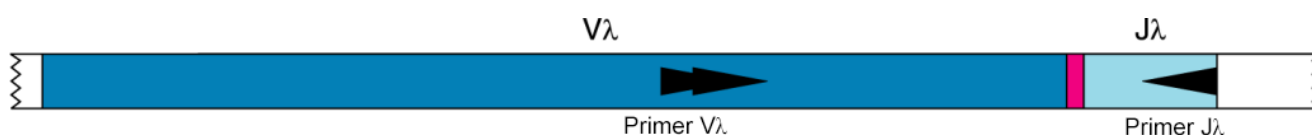
Questo saggio è basato sull'azione concertata BMH4-CT98-3936 di EuroClonality/BIOMED-2.



### 3. Principi della procedura

#### 3.1. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

I saggi PCR sono utilizzati abitualmente per l'identificazione di popolazioni clonali di linfociti B. Questi test amplificano il DNA tra i primer che identificano le regioni conservate framework (FR) della regione variabile (V) e le regioni conservate di giunzione (J) (*IGL Tube* (Provetta IGL)). 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 nelle cellule B, e i geni del recettore dei linfociti T nelle cellule T. Ciascun linfocita B e T ha un singolo riarrangiamento V-J produttivo che è unico sia in lunghezza che in sequenza. Pertanto, quando il DNA proveniente da una popolazione normale o policlonale è amplificato usando i primer di DNA che fiancheggiano la regione V-J, si genera una curva a campana (distribuzione gaussiana) di ampliconi all'interno di un intervallo di dimensioni atteso. Su un gel, questa distribuzione dei prodotti appare come una sbavatura (smear). Questa distribuzione gaussiana riflette la popolazione eterogenea dei riarrangiamenti V-J. In alcuni casi, in cui non è presente DNA dei linfociti, non si rileva 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.



#### ***IGL Tube* (Provetta IGL): 2 primer λ V + 1 primer Jλ**

Figura 1. È raffigurata una rappresentazione semplificata dell'organizzazione di un gene della catena leggera lambda delle immunoglobuline riarrangiato sul cromosoma 22q11.2. Le frecce nere rappresentano le posizioni relative dei primer. I due primer Vλ hanno come bersaglio Vλ1, 2 e 3 poiché queste tre famiglie coprono circa il 70% dei segmenti genici riarrangiabili Vλ. Inoltre, queste tre famiglie sono coinvolte in circa il 90% di tutti i riarrangiamenti genici *IGL*. Allo stesso modo, il primer Jλ singolo ha come bersaglio soltanto Jλ1, 2 e 3 poiché questi tre segmenti genici Jλ sono coinvolti nel 98% di tutti i riarrangiamenti genici *IGL*.

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 di fluorescenza differenziale

Il rilevamento di fluorescenza differenziale viene comunemente adoperato per identificare ampliconi di dimensioni diverse utilizzando uno strumento per elettroforesi capillare. I primer possono essere coniugati con svariati coloranti fluorescenti (fluorofori) in modo da produrre spettri di emissione diversi dopo eccitazione da parte di un laser nello strumento per elettroforesi capillare. In questo modo, a diversi coloranti fluorescenti possono corrispondere differenti regioni target. Questo sistema di rilevamento offre sensibilità ineguagliabile, risoluzione fino al singolo nucleotide, rilevamento differenziale dei prodotti e quantificazione relativa. Inoltre, si può eliminare del tutto l'uso di gel di agarosio e poliacrilammide, così come l'uso di sostanze cancerogene come il bromuro di etidio. Inoltre, la rilevazione differenziale permette un'interpretazione accurata, riproducibile e oggettiva di prodotti primer-specifici e l'archiviazione automatica dei dati. La riproducibilità a livello di determinazione delle dimensioni nella stessa analisi e tra analisi diverse mediante elettroforesi capillare è di circa 1 o 2 nucleotidi. Queste riproducibilità e sensibilità, combinate con l'archiviazione automatica dei dati dei campioni, permettono il monitoraggio, la tracciatura e il confronto dei dati dei singoli pazienti nel tempo.



## 4. Reagenti

### 4.1. Componenti del reagente

Tabella 1. Kit disponibili

N. di catalogo	Descrizione	Quantità
<b>REF</b> 91030011	IdentiClone <i>IGL</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 reazioni
<b>REF</b> 91030021	IdentiClone <i>IGL</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 reazioni

Tabella 2. Componenti del reagente

Reagente	N. di catalogo	Componenti del reagente (principi attivi)	Quantità unitaria	91030011 N. di unità	91030021 N. di unità	Temp. di conservazione
Master Mix	<b>REF</b> 21030011CE	<b>IGL Tube – 6FAM (Provetta IGL – 6FAM)</b> Oligonucleotidi multipli per la regione V $\lambda$ e la regione J $\lambda$ del gene codificante per la catena leggera lambda delle immunoglobuline in tampone salino.	1500 $\mu$ L	1	10	 -85°C -65°C
Master mix di amplificazione templatato	<b>REF</b> 20960021	<b>Specimen Control Size Ladder – 6FAM (Marcatore di dimensione per il controllo del campione - 6FAM)</b> Oligonucleotidi multipli per geni housekeeping target.	1500 $\mu$ L	1	10	
DNA di controllo positivo	<b>REF</b> 40880550	<b>IVS-0010 Clonal Control DNA (DNA di controllo clonale IVS-0010)</b> 200 $\mu$ g/mL di DNA in TE 1/10	100 $\mu$ L	1	5	 2°C 8°C oppure -65°C
	<b>REF</b> 40881690	<b>IVS-0029 Clonal Control DNA (DNA di controllo clonale IVS-0029)</b> 200 $\mu$ g/mL di DNA in TE 1/10	100 $\mu$ L	1	5	
DNA di controllo negativo (normale)	<b>REF</b> 40920010	<b>IVS-0000 Polyclonal Control DNA (DNA di controllo policlonale IVS-0000)</b> 200 $\mu$ g/mL di DNA in TE 1/10	100 $\mu$ 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 sistema. Non utilizzare reagenti di altri produttori. La diluizione, la riduzione dei volumi delle reazioni di amplificazione o altre deviazioni da questo protocollo possono influire sulle prestazioni di questo test e/o invalidare eventuali sublicenze limitate concesse con l'acquisto di questo kit di analisi.
- I materiali sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando conservati e maneggiati come indicato. Non utilizzare i kit oltre la data di scadenza.
- Il rigoroso rispetto del protocollo garantisce prestazioni e riproducibilità ottimali. Fare attenzione a utilizzare il programma del termociclatore corretto, poiché altri programmi potrebbero fornire dati imprecisi/errati, come risultati falsi positivi e falsi negativi.
- Non miscelare o combinare reagenti provenienti da kit con numeri di lotto diversi.
- Indossare adeguati dispositivi di protezione individuale e seguire le buone pratiche di laboratorio e le precauzioni universali quando si lavora con i campioni. I campioni devono essere maneggiati in strutture di contenimento per la sicurezza biologica approvate e aperti solo in cappe di biosicurezza certificate. Per la preparazione del DNA del campione utilizzare solamente acqua per biologia molecolare.
- A causa della sensibilità analitica di questo test, è necessario prestare estrema attenzione per evitare la contaminazione dei reagenti o delle miscele di amplificazione con campioni, controlli o materiali amplificati. Tutti i reagenti devono essere attentamente monitorati per la presenza di segni di contaminazione (*ad es.* controlli negativi che danno segnali positivi). Smaltire i reagenti di cui si sospetta la contaminazione.
- Per ridurre al minimo la contaminazione, indossare guanti puliti quando si maneggiano campioni e reagenti e pulire regolarmente le aree di lavoro e le pipette prima di eseguire la PCR.
- La sterilizzazione in autoclave non elimina la contaminazione del DNA. Il flusso di lavoro nel laboratorio di PCR deve essere unidirezionale: iniziare con la preparazione della master mix, passare alla preparazione del campione, quindi all'amplificazione e infine al rilevamento. Non portare il DNA amplificato nelle aree destinate alla preparazione della master mix o dei campioni.
- Tutte le pipette, i puntali delle pipette e qualsiasi apparecchiatura utilizzata in una determinata area devono essere dedicati a quella zona del laboratorio.
- Quando possibile, utilizzare materiale da laboratorio in plastica sterile monouso per evitare la contaminazione con RNasi e DNasi o la contaminazione crociata.

#### 4.3. Conservazione e manipolazione

- Se non utilizzati immediatamente, i kit del saggio devono essere **conservati a una temperatura compresa tra -85 °C e -65 °C**.
- La temperatura di conservazione ottimale per i controlli di DNA è compresa tra 2 °C e 8 °C, ma per la conservazione a lungo termine l'intervallo di temperatura indicato è compreso tra -85 °C e -65 °C.
- Tutti i reagenti e i controlli devono essere scongelati e passati al vortex o mescolati accuratamente prima dell'uso per garantire che siano risospesi completamente. L'agitazione eccessiva al vortex può danneggiare il DNA e causare il distacco dei fluorofori dai primer marcati.
- I materiali sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando conservati e maneggiati come indicato. Non utilizzare i kit oltre la data di scadenza.
- A causa delle elevate concentrazioni di sali, le master mix per PCR sono sensibili ai cicli di congelamento/scongelamento. Aliquotare le master mix in provette sterili con tappo a vite e relativa guarnizione, se necessario.

## 5. Strumenti

### 5.1. Termociclatore

- Uso o funzione: amplificazione dei campioni di DNA
- 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:
  - I seguenti strumenti di elettroforesi capillare soddisfano le esigenze di rendimento di quest'analisi:
    - ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (4-capillaries) (Analizzatore genetico 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 polimero e il tipo capillare.
- Consultare la sezione 7.5 *Rilevamento della fluorescenza ABI* per la preparazione del campione.

## 6. Raccolta e preparazione dei campioni

### 6.1. Precauzioni

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

### 6.2. Sostanze interferenti

È noto che le seguenti sostanze interferiscono con la PCR:

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

### 6.3. Requisiti e manipolazione dei campioni

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

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

### 6.4. Preparazione dei campioni

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

### 6.5. Conservazione dei campioni

Il DNA genomico (gDNA) deve essere conservato tra 2 °C e 8 °C oppure a lungo termine tra -85 °C a -65 °C.



## 7. Procedura del saggio

### 7.1. Materiali forniti

Tabella 3: Componenti del kit

N. di catalogo	Descrizione
<b>REF</b> 21030011CE	IGL Tube – 6FAM (Provetta IGL – 6FAM)
<b>REF</b> 20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM (Marcatore di dimensione per il controllo del campione - 6FAM)
<b>REF</b> 40880550	IVS-0010 Clonal Control DNA (DNA di controllo clonale IVS-0010)
<b>REF</b> 40881690	IVS-0029 Clonal Control DNA (DNA di controllo clonale IVS-0029)
<b>REF</b> 40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (DNA di controllo policlonale IVS-0000)

### 7.2. Materiali necessari (non forniti)

Tabella 4: Materiali necessari (non forniti)

Reagente/Materiale	Reagenti/Materiali consigliati e produttori	N. di catalogo ( <b>REF</b> )	Note
DNA polimerasi	Roche: <ul style="list-style-type: none"> <li>EagleTaq DNA Polymerase (DNA polimerasi EagleTaq)</li> </ul>	05206944190	N/D
	Invivoscribe, Inc.: <ul style="list-style-type: none"> <li>FalconTaq DNA Polymerase o equivalente</li> </ul>	60970130	
Acqua distillata in vetro, deionizzata, per biologia molecolare o acqua purificata per uso farmaceutico	N/D	N/D	Sterile e priva di DNasi e RNasi.
Pipette calibrate	Rainin: <ul style="list-style-type: none"> <li>pipette P-2, P-20, P-200 e P-1000</li> <li>o pipette SL-2, SL-20, SL-200 e SL-1000</li> </ul>	N/D	Devono essere in grado di misurare con precisione volumi compresi tra 1 µL e 1000 µL.
Termociclatore	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>Veriti Dx Thermal Cycler</li> </ul> Bio-Rad: <ul style="list-style-type: none"> <li>MJ Research PTC-100 o PTC-200, PTC-220, PTC-240</li> </ul> Perkin-Elmer <ul style="list-style-type: none"> <li>PE 9600 o PE 9700</li> </ul>	N/D	N/D
Agitatore vortex	N/A	N/D	N/D
Piastre o provette per PCR	N/D	N/D	Sterili
Puntali per pipetta con filtro	N/D	N/D	Privi di pirogeni/RNasi/DNasi, sterili
Provette per microcentrifuga	N/D	N/D	Sterili
Strumenti per elettroforesi capillare ABI	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>ABI 310, 3100 o 3500 series (ABI serie 310, 3100 o 3500)</li> </ul>	N/D	N/D
Formammide Hi-Di	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hi-Di™ Formamide (Formammide Hi-Di)</li> </ul>	4311320	N/D
Standard di riferimento	Invivoscribe, Inc.: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hi-Di Formamide con standard di riferimento ROX per ABI 3100</li> </ul>	60980061	N/D
	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Per strumenti ABI 3100 o 3130: <ul style="list-style-type: none"> <li>GeneScan™ - 400HD [ROX]™</li> </ul> </li> </ul>	402985	
	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Per strumenti ABI 3500: <ul style="list-style-type: none"> <li>GeneScan - 600 [LIZ]™ v2.0</li> </ul> </li> </ul>	4408399	
Set di coloranti per calibrazione spettrale	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Per strumenti ABI 3100 e 3130: <ul style="list-style-type: none"> <li>DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D)</li> </ul> </li> </ul>	4345827	N/D

Tabella 4: Materiali necessari (non forniti)

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

### 7.3. Preparazione dei reagenti

- Tutti i campioni sconosciuti possono essere analizzati utilizzando la master mix Specimen Control Size Ladder (Marcatore di dimensione per il controllo del campione) per garantire che non sia presente alcun inibitore dell'amplificazione e che il DNA sia di qualità e quantità sufficienti per produrre un risultato valido.
- I risultati di un unico test sono validi; tuttavia, ove possibile, eseguire l'analisi in **duplicato**. Se i risultati dei duplicati non sono coerenti, è necessario ripetere il test o l'analisi del campione.
- **I controlli positivi, negativi e senza template** devono essere analizzati per ciascuna master mix.

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

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

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

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

- Pertanto, il volume totale di aliquota per ogni master mix deve essere pari a **n x 45 µL**.
- Per la master mix Specimen Control Size Ladder (Marcatore di dimensione per il controllo del campione), il numero delle reazioni (**m**) è:

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

- Pertanto, il volume totale di aliquota per la master mix Specimen Control Size Ladder (Marcatore di dimensione per il controllo del campione) è pari a **m x 45 µL**.

- 7.3.3. Aggiungere 1,25 U (o 0,25  $\mu\text{L}$  a 5 U/ $\mu\text{L}$ ) di Taq DNA polymerase (DNA polimerasi Taq) per reazione a ogni master mix.
- Il totale di Taq DNA polymerase (DNA polimerasi Taq) aggiunto a ciascuna master mix è pari a  $n \times 0,25 \mu\text{L}$ , e  $m \times 0,25 \mu\text{L}$  per la master mix Specimen Control Size Ladder (Marcatore di dimensione per il controllo del campione).
  - Mescolare delicatamente mediante vortex.
- 7.3.4. Per ogni reazione, aliquotare 45  $\mu\text{L}$  della master mix appropriata + soluzione di DNA polymerase (DNA polimerasi) in singoli pozzetti su una piastra per PCR o in una provetta.
- 7.3.5. Aggiungere 5  $\mu\text{L}$  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 diverse volte su e giù per mescolare.
- 7.3.6. Tappare o coprire la piastra per PCR.
- A questo punto, i campioni sono pronti per essere amplificati su un termociclatore.
  - Se l'amplificazione non può essere eseguita immediatamente dopo la preparazione dei reagenti, la piastra o le provette per PCR possono essere conservate tra 2 °C e 8 °C fino a 24 ore.

**Guida rapida:**Per ciascuna master mix e  $n$  reazioni, mescolare: $n \times 45 \mu\text{L}$  Master Mix $n \times 0,25 \mu\text{L}$  DNA polimerasi Taq

Mescolare delicatamente mediante vortex.

Aliquotare 45  $\mu\text{L}$  della soluzione di master mix e DNA polimerasi in ciascun pozzetto di reazione.Aggiungere 5  $\mu\text{L}$  del templatato appropriato a ciascun pozzetto.Volume reazione totale = 50  $\mu\text{L}$ 

## 7.4. Amplificazione

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

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

**Tabella 5:** Condizioni per i cicli termici

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

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

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

## 7.5. Rilevamento della fluorescenza ABI

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

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

### Piattaforme ABI 3500:

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

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

### 7.6. Controllo di qualità

Con il kit sono forniti controlli positivi e negativi (o normali), che possono essere analizzati in singolo ogni volta che si effettua il saggio per garantire che sia stato eseguito correttamente. Inoltre, occorre includere un controllo senza template (*ad es.* acqua) per verificare l'eventuale contaminazione della master mix o la contaminazione crociata delle reazioni, dovuta all'impiego di una tecnica sterile impropria. È possibile anche aggiungere un controllo tampone per assicurare che non si sia verificata alcuna contaminazione del tampone utilizzato per risospendere i campioni. I valori dei controlli positivi sono riportati nella sezione 10.1 *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 su ogni strumento per elettroforesi capillare specifico possono differire di 1-4 nucleotidi (nt) rispetto a quelle elencate, a seconda della piattaforma di rilevamento e della versione del software di analisi utilizzati. Una volta identificata, la dimensione degli ampliconi determinata sulla piattaforma specifica sarà coerente tra i vari test. Questa riproducibilità è estremamente utile nel monitoraggio della ricorrenza della malattia.

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

Tabella 6: Controlli positivi raccomandati

Master mix	Bersaglio	Colore	DNA di controllo	N. di catalogo	Dimensioni del prodotto in nucleotidi (nt)
<b>IGL Tube</b>	Vλ - Jλ	Blu	<b>Range di dimensioni valido</b>	---	<b>135 - 170</b>
			IVS-0010 Clonal Control DNA	40880550	139 <sup>a</sup>
			IVS-0029 Clonal Control DNA	40881690	143 <sup>a</sup> , 156
<b>Specimen Control Size Ladder</b>	Geni multipli	Blu	<b>Range di dimensioni valido</b>	---	<b>996, 197, 297, 397, 602<sup>b</sup></b>
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	96, 197, 297, 397, 602 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Nota: può apparire un picco precedente debole di circa 127 nt.

<sup>b</sup>Nota: dal momento che sono amplificati preferibilmente frammenti di PCR di dimensioni inferiori, non è insolito avere il frammento di 602 nt con segnale ridotto o completamente assente. Per il rilevamento della fluorescenza ABI, il picco di 602 nt potrebbe non apparire durante i normali tempi di esecuzione. Inoltre, la dimensione di questo picco può discostarsi di oltre 30 nt quando la dimensione del frammento viene estrapolata usando standard di riferimento GeneScan - 400HD [ROX].

## 8. Interpretazione dei risultati

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

### 8.1. Analisi

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

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

Tipo di controllo	Risultato atteso	Risultato erraneo
<b>Controllo senza template</b>	Nessuna amplificazione presente, continuare con l'analisi.	Amplificazione presente, ripetere il saggio.
<b>Controllo policlonale</b>	Le dimensioni del prodotto sono coerenti con le dimensioni previste, elencate nella sezione <i>10.1 Dimensione attesa dei prodotti amplificati</i> . Nessun riarrangiamento clonale presente. Continuare con l'analisi.	Riarrangiamenti clonali presenti. Ripetere il saggio
<b>Controllo positivo</b> (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 <i>10.1 Dimensione attesa dei prodotti amplificati</i> . Continuare con l'analisi.	Ripetere il saggio.
<b>Specimen Control Size Ladder (Marcatore di dimensione per il controllo del campione)</b> (Questo controllo di amplificazione è <u>essenziale</u> per i campioni di quantità e qualità sconosciute)	Se sono visibili tutti i picchi di 96, 197, 297, 397 e 602 nt, continuare con l'analisi. Dal momento che vengono preferenzialmente amplificati frammenti di PCR di dimensioni inferiori, non è inconsueto che il frammento di 600 nt presenti un segnale ridotto o che sia del tutto assente. Continuare con l'analisi.	Se non ci sono bande visibili, ripetere il saggio <u>a meno che il campione non risulti positivo</u> . Se sono visibili solo 1, 2 o 3 bande, rivalutare il campione per verificare l'eventuale degradazione del DNA <u>a meno che il campione non risulti positivo</u> .

## 8.2. Interpretazione del campione

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

- Uno o due picchi positivi prominenti<sup>a</sup> all'interno del range di dimensioni valide vanno riportati come:  
**“Positivo per il rilevamento di riarrangiamento/i clonale/i dei geni codificanti per la catena leggera lambda delle immunoglobuline, coerente con la presenza di una popolazione clonale di cellule. Nel contesto dei criteri diagnostici complessivi, le popolazioni clonali di cellule possono indicare la presenza di neoplasia ematologica.”**
- L'assenza di picchi positivi<sup>a</sup> all'interno del range di dimensioni valide va riportata come:  
**“Negativo per l'identificazione di riarrangiamento/i clonale/i dei geni codificanti per la catena leggera lambda delle immunoglobuline.”**

<sup>a</sup>Nota: i criteri per la definizione di un picco positivo sono i seguenti:

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

## 9. Limiti della procedura

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

## 10. Valori attesi

### 10.1. Dimensioni attese dei prodotti amplificati

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

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

Tabella 8: Dimensioni attese dei prodotti amplificati

Master mix	Bersaglio	Colore	DNA di controllo	N. di catalogo	Dimensioni del prodotto in nucleotidi (nt)
<i>IGL</i> Tube	Vλ - Jλ	Blu	<b>Range di dimensioni valido</b>	---	<b>135 - 170</b>
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	135 - 170
			IVS-0010 Clonal Control DNA	40880550	139 <sup>a</sup>
			IVS-0029 Clonal Control DNA	40881690	143 <sup>a</sup> , 156
Specimen Control Size Ladder	Geni multipli	Blu	<b>Range di dimensioni valido</b>	---	<b>96, 197, 297, 397, 602<sup>b</sup></b>
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	96, 197, 297, 397, 602 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Nota: può apparire un picco precedente debole di circa 127 nt.

<sup>b</sup>Nota: dal momento che sono amplificati preferibilmente frammenti di PCR di dimensioni inferiori, non è insolito avere il frammento di 602 nt con segnale ridotto o completamente assente. Per il rilevamento della fluorescenza ABI, il picco di 602 nt potrebbe non apparire durante i normali tempi di esecuzione. Inoltre, la dimensione di questo picco può discostarsi di oltre 30 nt quando la dimensione del frammento viene estrapolata usando standard di riferimento GeneScan - 400HD [ROX].

## 10.2. Dati del campione

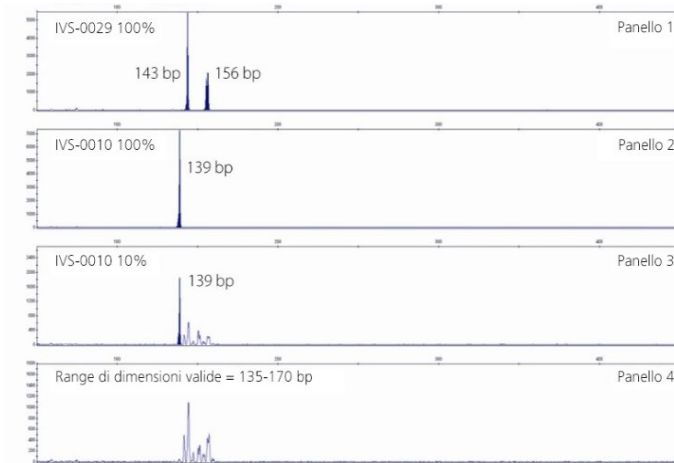


Figura 2. I dati mostrati a sinistra sono stati generati utilizzando la master mix *IGL Tube* (Provetta IGL).

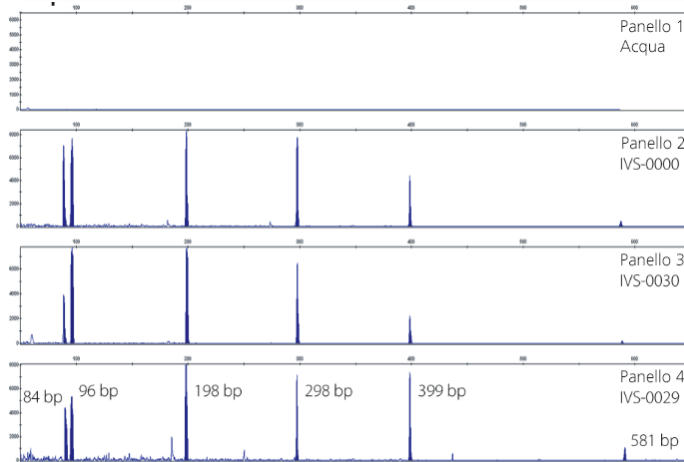


Figura 3. I dati riportati a sinistra sono stati generati usando la master mix Specimen Control Size Ladder (Marcatore di dimensione per il controllo del campione).

## 11. Caratteristiche prestazionali

Il saggio IdentiClone *IGL Gene 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.<sup>2</sup>

Tabella 9. Studi sulla concordanza

Concordanza PCR/SB: <sup>2</sup>		Concordanza PCR/SB: <sup>3</sup>	
<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/ 98% 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%

L'accuratezza diagnostica di questo test IdentiClone si è dimostrata essere di almeno l'89%. Non si sono verificati falsi positivi generati utilizzando i test IdentiClone e c'è stato un alto livello di precisione. Inoltre, un chiaro vantaggio di questa analisi è stato che i risultati clonali generati hanno permesso il successivo rilevamento di riarrangiamenti genici specifici del paziente e del tumore, per un rilevamento della malattia residuale minimo.

## 12. Bibliografia

1. Miller, JE, Wilson, SS, Jaye, DJ, Kronenberg, M. An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Mol. Diag.* 1999, **4(2)**:101-117.
2. Van Dongen, JJM *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003, **17(12)**:2257-2317.

## 13. Assistenza tecnica e Assistenza clienti

### Contatti



Invivoscribe, Inc

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

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

Assistenza tecnica: [support@invivoscribe.com](mailto:support@invivoscribe.com) | Servizio cliente: [sales@invivoscribe.com](mailto:sales@invivoscribe.com) | Sito web: [www.invivoscribe.com](http://www.invivoscribe.com)

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

## 14. Simboli

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

	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.