

Instrucciones de uso



# IdentiClone<sup>®</sup> Dx

IGH Assay

**IVD** Para uso diagnóstico *in vitro*.

Número de catálogo

**REF** 91010101

Producto(s)

IdentiClone Dx IGH Assay


**UDI**

00810022732502

Cantidad

33 reacciones

Condiciones de conservación

-30°C  -15°C

# Índice

<b>1.</b>	<b>USO PREVISTO.....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>INDICACIONES / CONTRAINDICACIONES.....</b>	<b>3</b>
<b>3.</b>	<b>GLOSARIO Y ABREVIATURAS.....</b>	<b>3</b>
3.1.	Glosario.....	3
3.2.	Abreviaturas.....	4
<b>4.</b>	<b>RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA.....</b>	<b>5</b>
4.1.	Antecedentes.....	5
4.2.	Descripción general.....	5
<b>5.</b>	<b>PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO.....</b>	<b>6</b>
5.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	6
5.2.	Detección por fluorescencia.....	6
5.3.	Análisis de software.....	6
5.4.	Usuario final y entorno de uso.....	7
<b>6.</b>	<b>REACTIVOS.....</b>	<b>7</b>
6.1.	Componentes del reactivo.....	7
6.2.	Conservación y manipulación de los reactivos.....	8
6.3.	Advertencias y precauciones.....	8
6.4.	Reactivos, materiales y equipo.....	9
<b>7.</b>	<b>RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LOS ESPECÍMENES.....</b>	<b>11</b>
7.1.	Precauciones.....	11
7.2.	Sustancias interferentes.....	11
7.3.	Requisitos y estabilidad de los especímenes.....	11
7.4.	Preparación de las muestras.....	11
7.5.	Conservación de las muestras.....	11
<b>8.</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA.....</b>	<b>12</b>
8.1.	Preparación de la mezcla maestra.....	13
8.2.	Amplificación por PCR.....	14
8.3.	Preparación de la placa de detección.....	14
8.4.	Instalar parámetros de ensayo.....	15
8.5.	Análisis de fragmentos por electroforesis capilar.....	18
8.6.	Control de calidad.....	20
<b>9.</b>	<b>INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
9.1.	Puntos de comprobación del software.....	21
<b>10.</b>	<b>REPETICIÓN DE LAS PRUEBAS, SI PROCEDE.....</b>	<b>22</b>
10.1.	Desarrollos no válidos.....	22
10.2.	Muestras no válidas en un desarrollo válido.....	22
10.3.	Códigos de error y repetición de la prueba.....	23
<b>11.</b>	<b>LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.....</b>	<b>23</b>
<b>12.</b>	<b>EFICACIA DIAGNÓSTICA.....</b>	<b>24</b>
12.1.	Validaciones de muestras y especímenes: estabilidad de los especímenes.....	24
12.2.	Valor de corte clínico.....	25
12.3.	Sensibilidad analítica: Límite de blanco (LB).....	26
12.4.	Sensibilidad analítica: Límite de detección (LD).....	27
12.5.	Especificidad analítica: Sustancias interferentes.....	29
12.6.	Especificidad analítica: Contaminación cruzada / por arrastre.....	30
12.7.	Especificidad analítica: Estudio de precisión intralaboratorio.....	31
12.8.	Precisión de la medición: Estudio de reproducibilidad multicéntrico.....	32
12.9.	Validación del flujo de trabajo del ensayo: Estudio de extracción de ADN.....	32
12.10.	Validación del flujo de trabajo del ensayo: Estudio de entrada de ADN.....	34
12.11.	Validación del flujo de trabajo del ensayo: Equivalencia: 3500xL frente a 3500xL Dx.....	35
12.12.	Validación clínica.....	36
<b>13.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>39</b>
<b>14.</b>	<b>SERVICIO TÉCNICO Y ATENCIÓN AL CLIENTE.....</b>	<b>39</b>
<b>15.</b>	<b>SÍMBOLOS.....</b>	<b>40</b>
<b>16.</b>	<b>AVISO LEGAL.....</b>	<b>40</b>
<b>17.</b>	<b>HISTORIAL DE REVISIONES.....</b>	<b>40</b>

## 1. Uso previsto

El IdentiClone Dx *IGH* Assay («ensayo») es un producto de diagnóstico *in vitro* indicado para la detección basada en electroforesis capilar de clonalidad en reordenamientos de genes de cadena pesada de inmunoglobulina (*IGH*) en especímenes de sangre periférica como método complementario para el diagnóstico de pacientes con sospecha de enfermedad linfoproliferativa de células B.

Los resultados positivos (es decir, la detección de clonalidad) no deben ser el único criterio para determinar la presencia de enfermedad. Los resultados negativos no descartan la enfermedad linfoproliferativa. En el diagnóstico final de la enfermedad linfoproliferativa deben tenerse en cuenta las pruebas de laboratorio adicionales (p. ej., recuentos de leucocitos [LEU], morfología, inmunohistoquímica, detección de mutaciones conductoras, citometría de flujo, etc.) y la presentación clínica.

Este ensayo cualitativo no automatizado es para uso en los ABI 3500xL Dx y ABI 3500xL Genetic Analyzers.

## 2. Indicaciones / Contraindicaciones

No se identifican contraindicaciones.

## 3. Glosario y abreviaturas

### 3.1. Glosario

Tabla 1. Glosario de términos específicos del IdentiClone Dx *IGH* Assay

Término	Definición
<b>Amplíción</b>	Copias multiplicadas de fragmentos de ADN creadas mediante amplificación (p. ej., PCR).
<b>Amplificación</b>	Hacer varias copias de una secuencia de ADN o gen (p. ej., PCR).
<b>Artefacto</b>	Un pico rojo detectado por el análisis de fragmentos en el ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer que está a menos de 0,5 pares de bases de hasta los 5 picos azules o verdes más altos. Si el pico de artefacto es igual o mayor que el pico azul o verde asociado, el resultado de la mezcla maestra (MM) asociada se considerará no válido.
<b>Clan</b>	Los reordenamientos de los genes <i>IGH</i> se identifican mediante el IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay mediante el uso de cebadores dirigidos a los 7 subgrupos de genes IGHV, IGHV1–7. Los subgrupos de genes de IGHV pueden categorizarse adicionalmente en clanes de genes de IGHV (clan I, II y III) en función de la similitud de sus secuencia. <sup>15</sup> El clan I incluye los subgrupos de genes IGHV1, IGHV5 e IGHV7, el clan II incluye los subgrupos de genes IGHV2, IGHV4 e IGHV6, y el clan III incluye el subgrupo de genes IGHV3.
<b>Clonal</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Un resultado <i>ID de la muestra</i> (llamada global) en el que se detecta clonalidad.</li> <li>Un resultado <i>Nombre de la muestra</i> (para una MM) en el que se detecta un pico significativo en el rango de tamaños válido.</li> </ul>
<b>Detección</b>	Parte del ensayo en el que se separan los amplicones por electroforesis capilar y se detectan como picos.
<b><i>In vitro</i></b>	Que ocurre fuera de un organismo vivo.
<b>Indeterminado</b>	Un resultado de muestra en el que los 3 resultados de la mezcla maestra (MM) generaron resultados indeterminados; o un resultado de MM de muestra en el que no puede determinarse la presencia o ausencia de clonalidad (es decir, resultado ambiguo)
<b>No válido</b>	Un resultado de muestra en el que los 3 resultados de la mezcla maestra no son válidos; o un resultado de MM de muestra que no cumple los criterios de validez (consulte la tabla 8).
<b>Enfermedad linfoproliferativa</b>	Trastorno caracterizado por la proliferación anómala de linfocitos.
<b>Producto de mezcla maestra</b>	Amplicones generados a partir de la amplificación de 3 MM diferentes: MM tubo <i>IGH</i> A (FR1), MM tubo <i>IGH</i> B (FR2), MM tubo <i>IGH</i> C (FR3).
<b>Control negativo</b>	Solución tampón que contiene ADN policlonal; se espera que este control genere un <i>resultado no clonal con cada mezcla maestra</i> .
<b>No clonal</b>	Un resultado de muestra en el que no se detecta clonalidad o un resultado de MM de muestra en el que no se detecta un pico significativo dentro del rango de tamaño válido.

Tabla 1. Glosario de términos específicos del IdentiClone Dx *IGH* Assay

Término	Definición
Mapa de placa	Representación visual de una placa de detección, importada al ABI Genetic Analyzer. Este archivo proporciona un esquema de placa de 96 pocillos que contiene información del desarrollo asociado, como la <i>Sample ID (ID de la muestra)</i> , el <i>Sample Name (Nombre de la muestra)</i> , el <i>Sample Type (Tipo de muestra)</i> y la <i>Master Mix (Mezcla maestra)</i> para cada ubicación de pocillo.
Control positivo	Solución tampón que contiene ADN utilizada para evaluar la validez del ensayo; se espera que este control genere un resultado clonal con cada mezcla maestra.
ID de la muestra	Identificación única asociada con una muestra de paciente. Es necesario analizar cada <i>ID de la muestra</i> con cada mezcla maestra ( $n = 3$ ) incluida con el ensayo. Los resultados de la prueba individuales de la mezcla maestra y específicos del desarrollo se identifican con el <i>Nombre de la muestra</i> . Cada <i>ID de la muestra</i> tendrá al menos 3 resultados de nombre de muestra asociados. Consulte un ejemplo en la Figura 10.
Nombre de la muestra	Identificación única asociada a los resultados de pruebas de mezcla maestra y específicos del desarrollo asociados a una <i>ID de la muestra</i> (muestra de paciente). Consulte un ejemplo en la Figura 10.
Saturación	Presencia de pico con URF excesivamente altas ( $\geq 30\ 000$ )
Error de calidad de tamaño (CT)	Un error determinado en un ABI 3500xL o ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer en el que la similitud calculada entre el patrón de fragmentos de tinción del estándar de tamaño específico y la distribución observada de los picos del estándar de tamaño en una muestra no alcanzó el umbral predeterminado.
Pico significativo	Un pico dominante dentro de un rango de tamaños válido.

### 3.2. Abreviaturas

Tabla 2. Definiciones de las abreviaturas

Acrónimo	Definición
pb	Par de bases
EC	Electroforesis capilar; método electrocinético utilizado para separar los amplicones por tamaño.
IC	Intervalo de confianza
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CNA	Convención de nombre de archivo; sistema para asignar nombres a los archivos de forma que describa lo que contienen y cómo se relacionan con otros archivos.
FSA	Archivo de datos de análisis de fragmentos creado por el instrumento de electroforesis capilar.
ADNg	ADN genómico
IFU	Instrucciones de uso
<i>IGH</i>	Gen de cadena pesada de inmunoglobulina
<i>IGHFR1/2/3</i>	Los marcos conservados 1, 2 y 3 si el gen <i>IGH</i>
IUO	Solo para uso en investigación
IVD	Diagnóstico <i>in vitro</i>
LI	Límite inferior
LB	Límite de blanco
LD	Límite de detección
MM	Mezcla maestra
N/A	No aplicable
CB	Control en blanco (agua); se espera que este control no genere picos amplificados dentro del rango de tamaños válido.
CPN	Concordancia porcentual negativa

Tabla 2. Definiciones de las abreviaturas

Acrónimo	Definición
CPG	Concordancia porcentual global
SP	Sangre periférica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CPP	Concordancia porcentual positiva
SPC	Sangre periférica combinada
RPR	Cociente pico relativo, el valor utilizado para determinar la clonalidad.
RUO	Solo para uso en investigación
CT	Calidad de tamaño; una presentación numérica de la similitud entre el patrón de fragmentos para el patrón de tinción específico de tamaño en la definición del patrón de tamaño y la distribución real de los picos del patrón de tamaño en la muestra.
XLSX	Un formato de archivo compatible con las versiones de Office 2010 y posteriores. Este formato de archivo puede utilizarse para crear el registro de placa en los ABI 3500xL Dx y ABI 3500xL Genetic Analyzers.
XML	Archivo de lenguaje de marcado extensible diseñado para almacenar y transportar datos. Este formato de archivo se utiliza para los parámetros del instrumento del IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay, el grupo de resultados y la convención de nombre de archivo para los ABI 3500xL Dx y ABI 3500xL Genetic Analyzers (incluido con <b>REF</b> 91010111).

## 4. Resumen y explicación de la prueba

### 4.1. Antecedentes

Se calcula que cada año se diagnostican más de 900 000 nuevos casos de enfermedades linfoproliferativas de las células B en todo el mundo, teniendo en cuenta la variedad de enfermedades que se incluyen en esta categoría.<sup>1,2,3</sup> Los trastornos linfoproliferativos de las células B, como linfomas y leucemias, a menudo surgen debido a la disregulación de los procesos normales de desarrollo de las células B, especialmente en los reordenamientos de los genes de las cadenas pesadas de la inmunoglobulina (*IGH*).

Durante la ontogenia en linfocitos B, el gen *IGH* sufre un proceso denominado recombinación V(D)J, donde la variable ( $V_H$ ), diversidad ( $D_H$ ), y los segmentos génicos de unión ( $J_H$ ) se reordenan aleatoriamente.<sup>4,5</sup> Estos segmentos de genes reordenados aumentan la diversidad genética, generando aproximadamente  $10^{12}$  secuencias de ADN únicas, y permiten al sistema inmunitario reconocer una amplia variedad de antígenos.<sup>4,5,6</sup> Sin embargo, en las enfermedades linfoproliferativas de las células B, un solo clon de células B con una reordenación particular de *IGH* prolifera anormalmente, lo que da lugar a una población de células B con reordenamientos idénticos (o clonales) del gen *IGH*. La detección de estas expansiones clonales es una característica definitoria de las neoplasias de células B.<sup>4,5,6,7,8,9</sup>

Cuando se aplica la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a estos reordenamientos genéticos, se generan productos de longitud y secuencia únicas para cada célula.<sup>6,7,8,9</sup> Por lo tanto, esta metodología puede aplicarse para identificar poblaciones de linfocitos derivadas de una sola célula, identificando los reordenamientos únicos del gen V-J presentes en el locus de *IGH*.<sup>6,8,9,10</sup> La presencia de reordenamientos clonales de *IGH* se utiliza para confirmar el diagnóstico de enfermedades linfoproliferativas de las células B y distinguir las proliferaciones linfoides malignas de las benignas.<sup>11,12,13,14</sup>

### 4.2. Descripción general

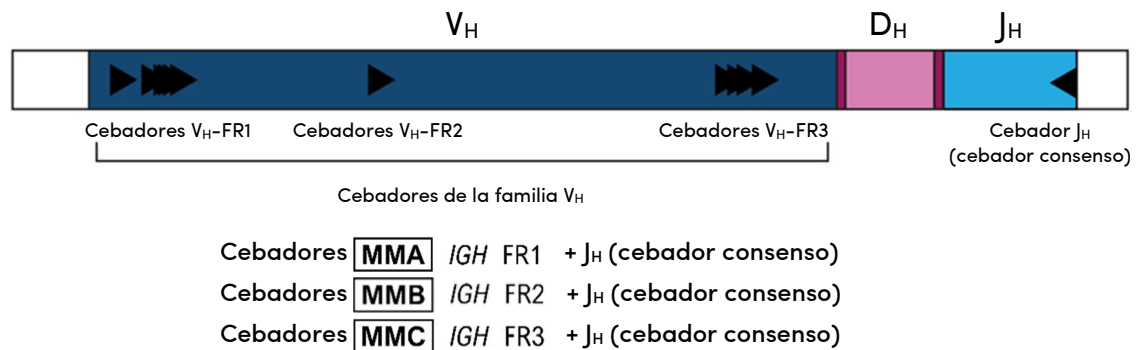
El IdentiClone Dx *IGH* Assay incluye tres mezclas maestras para PCR (MM), un control positivo (*IGH* POS [+]), un control negativo (NEG [-]), un control en blanco (CB), ADN polimerasa Taq y el paquete de software IdentiClone Dx *IGH* Software. Las mezclas maestras del ensayo utilizan varios cebadores consenso marcados con fluorescencia diseñados para dirigirse a los marcos conservados (FR1, 2 y 3) dentro de las regiones  $V_H$  y  $J_H$  del locus de *IGH*. Tras la amplificación, los amplicones marcados con fluoróforo se fraccionan por tamaño, generando perfiles de amplicones para cada mezcla maestra de PCR. A continuación, los datos resultantes se cargan en el IdentiClone Dx *IGH* Software para su análisis, con el fin de determinar la validez y el estado de clonalidad. Se compilan resultados válidos de cada mezcla maestra para establecer el estado de clonalidad de cada espécimen: Clonal, no clonal, no válido o indeterminado.

## 5. Principios del procedimiento

### 5.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Debido a que la región variable ( $V_H$ ) está sujeta a mutaciones somáticas, es difícil emplear un solo conjunto de cebadores de PCR para dirigirse a todas las regiones conservadas que flanquean los reordenamientos de  $V_H$ - $J_H$ . Por ese motivo, el IdentiClone Dx *IGH* Assay utiliza varios cebadores consenso de PCR dirigidos a tres marcos (FR1, FR2 y FR3) y la región  $J_H$  del gen *IGH*. Los cebadores consenso se conjugan con tinciones fluorescentes y se contienen en tres mezclas maestras individuales: MMA, MMB y MMC. (Figura 1) Estas mezclas maestras amplifican los tres marcos (FR) y las dos regiones determinantes de complementariedad (CDR) del ADN genómico (ADNg) aislado de especímenes de sangre periférica.

Figura 1. La organización de un gen de cadena pesada de inmunoglobulina reordenado en el cromosoma 14. Las flechas negras representan las posiciones relativas de los cebadores que se dirigen al marco conservado (FR1/2/3) y los segmentos de los genes  $J_H$  de consenso secuencia abajo. Los amplicones derivados de estas regiones se detectan usando conjuntos de cebadores fluorescentes e instrumentos de electroforesis capilar para la detección por fluorescencia.



### 5.2. Detección por fluorescencia

Tras la amplificación, cada producto de PCR se procesa en un instrumento ABI 3500xL Dx o ABI 3500xL Genetic Analyzer, en el que los amplicones marcados con fluoróforo se fraccionan por tamaño. Los parámetros de desarrollo específicos del ensayo, como la configuración del instrumento, grupos de resultados y la convención de nombre de archivo, se incluyen como archivos XML en el paquete IdentiClone Dx *IGH* Software y deben configurarse antes de realizar el ensayo por primera vez. Una vez configurados, los perfiles de amplicones de cada mezcla maestra para PCR se recogen como formato de archivo FSA y se cargan en el IdentiClone Dx *IGH* Software para su interpretación.

### 5.3. Análisis de software

El IdentiClone Dx *IGH* Software está diseñado para complementar al IdentiClone Dx *IGH* Assay y eliminar la subjetividad de la interpretación del electroferograma. Los archivos de datos sin procesar generados por los amplicones del ensayo con detección por fluorescencia se analizan para determinar su validez y estado de clonalidad, haciendo referencia a un mapa de placa configurado para la trazabilidad de las muestras.

Dado que este ensayo requiere tres mezclas maestras para determinar el estado de clonalidad, se utiliza una jerarquía de nombres para correlacionar los resultados de la mezcla maestra, identificados por un *Sample Name* (Nombre de la muestra), con la muestra del paciente, que se identifica por un *Sample ID* (ID de la muestra) (consulte la Figura 9). Cada conjunto de pruebas de mezcla maestra, incluidas las muestras, un control positivo, un control negativo y un control en blanco, se considera un «desarrollo», y puede configurarse individualmente mediante la función de configuración de placas del software y cargarse en la misma placa, que contiene desarrollos adicionales. Una vez finalizada la detección, los archivos de datos se cargan en el software, que procede al análisis, haciendo referencia al mapa de placa para completar el análisis intermedio para esa mezcla maestra. Si se determina que los desarrollos de las tres mezclas maestras son válidos, los datos se procesan para generar resultados intermedios, representados por *Sample Names* (Nombres de muestras), que se muestran para que el usuario elija y genere el estado de clonalidad de cada *Sample ID* (ID de la muestra). Para obtener más detalles, consulte las instrucciones de uso correspondientes del IdentiClone Dx *IGH* Software.

## 5.4. Usuario final y entorno de uso

- 5.4.1. Este producto es solo para uso profesional en laboratorios clínicos.  
 5.4.2. El producto no está indicado para pruebas en entornos cercanos al paciente ni para autodiagnóstico.  
 5.4.3. El producto no es un ensayo de diagnóstico complementario.

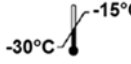

## 6. Reactivos

### 6.1. Componentes del reactivo

Tabla 3. Kits disponibles

Número de catálogo	Descripción	Cantidad
<b>REF</b> 91010101	IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay	33 reacciones

Tabla 4. Componentes reactivos (componentes del kit)

Reactivo	Número de referencia	Componentes del reactivo (principios activos)	Cantidad por unidad	Número de unidades	Temperatura de almacenamiento
Mezclas maestras	<b>REF</b> 21010191	<b>MMA</b> <i>IGH</i> FR1 Distintos oligonucleótidos dirigidos a la región marco 1 del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina en una solución salina amortiguada.	1500 µl	1	 -30°C -15°C
	<b>REF</b> 21010201	<b>MMB</b> <i>IGH</i> FR2 Distintos oligonucleótidos dirigidos a la región marco 2 del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina en una solución salina amortiguada.	1500 µl	1	
	<b>REF</b> 21010211	<b>MMC</b> <i>IGH</i> FR3 Distintos oligonucleótidos dirigidos a la región marco 3 del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina en una solución salina amortiguada.	1500 µl	1	
ADN de control positivo de <i>IGH</i>	<b>REF</b> 40883460	<b>CONTROL +</b> <i>IGH</i> ADNg de células cultivadas en una solución salina amortiguada	100 µl	1	
ADN de control negativo	<b>REF</b> 40920070	<b>CONTROL -</b> ADNg de células cultivadas en una solución salina amortiguada	100 µl	1	
Control en blanco (CB)	<b>REF</b> 40930010	<b>CONTROL NTC</b> Agua	100 µl	1	
FalconTaq® DNA Polymerase	<b>REF</b> 60970150	<b>TAQ</b> Enzima ADN polimerasa FalconTaq	50 µl	1	
Paquete IdentiClone Dx <i>IGH</i> Software	<b>REF</b> 91010111	<b>IdentiClone Dx <i>IGH</i> Software</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>IdentiClone-Dx-<i>IGH</i>-Software-1.2.x.IVD.msi</li> </ul> <b>Parámetros del IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay</b> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>IGH_IP.xml</i></li> <li><i>IGH_FNC.xml</i></li> <li><i>IGH_RG.xml</i></li> </ul>	1 paquete de software	1	 15°C 30°C

## 6.2. Conservación y manipulación de los reactivos

- 6.2.1. Si no va a hacer un uso inmediato de los kits de ensayo, **consérvelos a una temperatura de entre -30 °C y -15 °C.**
  - 6.2.1.1. Almacene las mezclas maestras de PCR en un lugar oscuro para proteger los cebadores marcados con fluoróforo.
- 6.2.2. Tras abrir el kit del ensayo, inspeccione visualmente cada reactivo para comprobar si presenta daños o fugas.
- 6.2.3. Descongele y agite en vórtex bien todos los reactivos y controles antes de usarlos para asegurarse de que estén completamente resuspendidos y homogéneos.

**¡IMPORTANTE!** Una agitación vorticial excesiva puede dañar el ADN y hacer que los cebadores marcados pierdan sus fluoróforos. **NO agite en vórtex el tubo que contiene ADN polimerasa Taq.**

- 6.2.3.1. Agite el volumen en el agitador vórtex a velocidad máxima durante 5 a 15 segundos.
- 6.2.3.2. Centrifugue de 2 a 5 segundos.
- 6.2.3.3. Si se almacenan y manipulan según las instrucciones, los materiales abiertos son estables durante 6 meses o 5 ciclos de congelación-descongelación, o hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. No utilice los kits después de su fecha de caducidad.

## 6.3. Advertencias y precauciones

**IVD** Este producto es solo para uso profesional.

- 6.3.1. Utilice este kit de ensayo a modo de sistema. No utilice los reactivos de otros fabricantes. Cualquier alteración del protocolo —como la realización de diluciones o reducciones de las reacciones de amplificación— puede afectar al rendimiento de la prueba e implicar la anulación de cualquier licencia limitada derivada de la adquisición de estos kits.
- 6.3.2. El cumplimiento del protocolo garantizará un rendimiento y una reproducibilidad óptimos. Asegúrese de usar el programa adecuado del termociclador, ya que, si usa otros programas, los resultados podrían ser imprecisos o erróneos, como falsos positivos y falsos negativos.
- 6.3.3. Elimine los reactivos no utilizados y los residuos de acuerdo con las normativas nacionales, regionales y locales.
- 6.3.4. No mezcle ni combine reactivos de kits con diferentes números de lote.
- 6.3.5. El personal de laboratorio debe usar equipos de protección personal estándar, seguir las prácticas óptimas de laboratorio y tomar las precauciones necesarias cuando trabaje con especímenes. Manipule siempre los especímenes en instalaciones aprobadas de contención de seguridad biológica y ábralos solo en campanas de seguridad biológica certificadas.
- 6.3.6. Dado que se trata de una prueba de sensibilidad analítica, sea extremadamente cauteloso para evitar la contaminación de los reactivos o mezclas de amplificación con muestras, controles o material amplificado. Deben controlarse todos los reactivos para detectar signos de contaminación (p. ej., controles negativos que den señales positivas). Elimine cualquier reactivo que pueda haberse contaminado.
- 6.3.7. Para reducir al mínimo la contaminación, use guantes limpios cuando manipule muestras y reactivos y limpie de manera regular las zonas de trabajo y las pipetas antes de realizar la PCR.
- 6.3.8. El autoclave no elimina la contaminación del ADN.
- 6.3.9. El flujo de trabajo en el laboratorio de PCR sigue una secuencia de trabajo unidireccional entre zonas de trabajo: comience con la preparación de especímenes, pase a la preparación de mezclas maestras, después la amplificación y, por último, la detección. No introduzca amplicones (es decir, placa de PCR después de la amplificación) en las zonas designadas para la mezcla maestra o la preparación de especímenes.
- 6.3.10. Mantenga todas las pipetas, puntas de pipetas y cualquier otro instrumento utilizado en una zona específica del laboratorio reservada para tal fin.
- 6.3.11. Siempre que sea posible, utilice material plástico estéril desechable para evitar la contaminación con RNasa y DNasa o la contaminación cruzada.
- 6.3.12. Cuando el recipiente del polímero POP-7 haya alcanzado la temperatura ambiente, examine el interior del cuello en el punto de instalación. Asegúrese de que el recipiente no contenga restos de polímero secos ni cristalizados. No introduzca el recipiente en el instrumento ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer si observa cristalización, pues esta podría afectar al rendimiento del ensayo o el instrumento. Póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de Thermo Fisher Scientific.
- 6.3.13. Cualquier incidencia grave que se haya producido en relación con el producto debe comunicarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro del usuario o paciente.

#### 6.4. Reactivos, materiales y equipo

Realice el mantenimiento de todo el equipo siguiendo las instrucciones del fabricante. Tabla 5 enumera los reactivos, materiales y equipos necesarios que no se suministran en el kit.

**Tabla 5. Reactivos, materiales y equipos necesarios (no proporcionados)**

Reactivo / Material / Equipo	Proveedores y reactivos recomendados / Materiales / Equipo	Notas
Tiras de 8 tapas	N/A	Sin DNasa, RNasa, ADN e inhibidores de PCR
Membranas de goma de 96 pocillos	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>Membrana de goma para 3500xL Dx Genetic Analyzers, 96 pocillos</li> <li>Membranas para placa de 96 pocillos, para 3500/SeqStudio™ Flex</li> </ul>	N/A
Lámina adhesiva de sellado de placas	N/A	Sin DNasa y RNasa
Contenedor de amortiguador anódico	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>Contenedor de amortiguador anódico para 3500 Dx/3500xL Genetic Analyzers</li> <li>Contenedor de amortiguador anódico (ABC), para 3500/SeqStudio Flex</li> </ul>	Sin DNasa y RNasa
Pipetas calibradas	N/A	Deben ser capaces de medir con precisión volúmenes de entre 1 µl y 1000 µl
Matriz de capilares	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>Matriz de 24 capilares para 3500xL Dx Genetic Analyzer, 50 cm</li> <li>Matriz de 24 capilares para 3500xL Genetic Analyzer, 50 cm</li> </ul>	N/A
Instrumento de electroforesis capilar	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>(UE) 3500xL Dx Genetic Analyzer con software de recogida de datos 3 IVD v3.0 serie 3500 Dx</li> <li>(EE. UU.) 3500xL Dx Genetic Analyzer con software de recogida de datos 3 IVD v3.2 serie 3500 Dx</li> <li>3500xL Genetic Analyzer con software de recogida de datos v1.0 serie 3500</li> </ul>	Asegúrese de que el instrumento esté calibrado con el DS-33 Matrix Standard Kit (juego de tinción G5) con el patrón de tamaño GeneScan 600 LIZ v2.0
Contenedor de amortiguador catódico	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>Contenedor de amortiguación catódica para 3500 Dx/3500xL Genetic Analyzers</li> <li>Contenedor de amortiguación catódica (CAC), para 3500/SeqStudio Flex</li> </ul>	N/A
Membrana de goma de amortiguador catódico	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>Membrana de goma para el contenedor de amortiguación catódica para los 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzers</li> <li>Membrana de goma para el contenedor de amortiguación catódica para 3500 y SeqStudio Flex</li> </ul>	N/A
Reactivo de acondicionamiento	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>Reactivo de acondicionamiento para 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzers</li> <li>Reactivo de acondicionamiento, para 3500/SeqStudio Flex</li> </ul>	N/A

Tabla 5. Reactivos, materiales y equipos necesarios (no proporcionados)

Reactivo / Material / Equipo	Proveedores y reactivos recomendados / Materiales / Equipo	Notas
Puntas de pipeta con barrera de filtro	N/A	Estériles y sin RNasa, DNasa y pirógenos
Hi-Di Formamide	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hi-Di™ Formamide, 3500 Dx Series</li> <li>Hi-Di Formamide</li> </ul>	N/A
Tubos de unión baja	N/A	Para almacenar ADNg; RNasa, DNasa, ADN, sin inhibidores de PCR
Patrones de tamaño LIZ	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>Patrón de tamaño GeneScan™ 600 LIZ® v2.0 – Dx</li> <li>Patrón de tamaño v2.0 GeneScan 600 LIZ</li> </ul>	N/A
Microcentrifugadora	N/A	Estéril
Espectrofotómetro UV-Vis de microvolúmenes	N/A	Capaz de determinar la absorbancia a 260 nm para el cálculo de la concentración del ácido nucleico
Placas o tubos para PCR	N/A	Sin DNasa, RNasa, ADN e inhibidores de PCR
Centrifugadora de placas	N/A	Centrifugadora con capacidad para 1000 RCF
Polímero POP-7	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>POP-7™ (384) polímero de rendimiento optimizado para serie 3500 Dx</li> <li>Polímero POP-7, para 3500/SeqStudio™ Flex</li> </ul>	N/A
Conjunto de base y retenedor	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>Conjunto de base y retenedor (estándar) para los 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzers, 96 pocillos</li> <li>Conjunto de base y retenedor (estándar) para los 3500/3500xL Genetic Analyzers, 96 pocillos</li> </ul>	N/A
Agua estéril	N/A	Estéril y sin RNasa y DNasa
Termociclador	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>Veriti™ Dx</li> </ul>	N/A
Tampón Tris-EDTA (TE)	N/A	Solución de 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 y 1 mM EDTA Nota: diluya 1:10 con agua
Agitador vórtex	N/A	N/A

Póngase en contacto con el fabricante para obtener los números de referencia de los artículos de su región.

## 7. Recogida y preparación de los especímenes

### 7.1. Precauciones

Los especímenes biológicos procedentes de seres humanos pueden contener materiales posiblemente infecciosos. Manipule todos los especímenes de acuerdo con la norma de la OSHA sobre patógenos de transmisión hemática y de acuerdo con un nivel de bioseguridad 2.

### 7.2. Sustancias interferentes

Se sabe que las siguientes sustancias interfieren con la amplificación por PCR; evite, si es posible:

- 7.2.1. Quelantes de cationes divalentes
- 7.2.2. Puntas de pipeta de baja retención
- 7.2.3. EDTA (no significativo en concentraciones bajas)
- 7.2.4. Heparina

### 7.3. Requisitos y estabilidad de los especímenes

Este ensayo requiere al menos 0,5 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA.

- 7.3.1. El espécimen puede conservarse a entre 2 °C y 8 °C durante un máximo de 7 días antes del análisis.
- 7.3.2. El espécimen puede enviarse con una placa de frío; nunca debe congelarse.

### 7.4. Preparación de las muestras

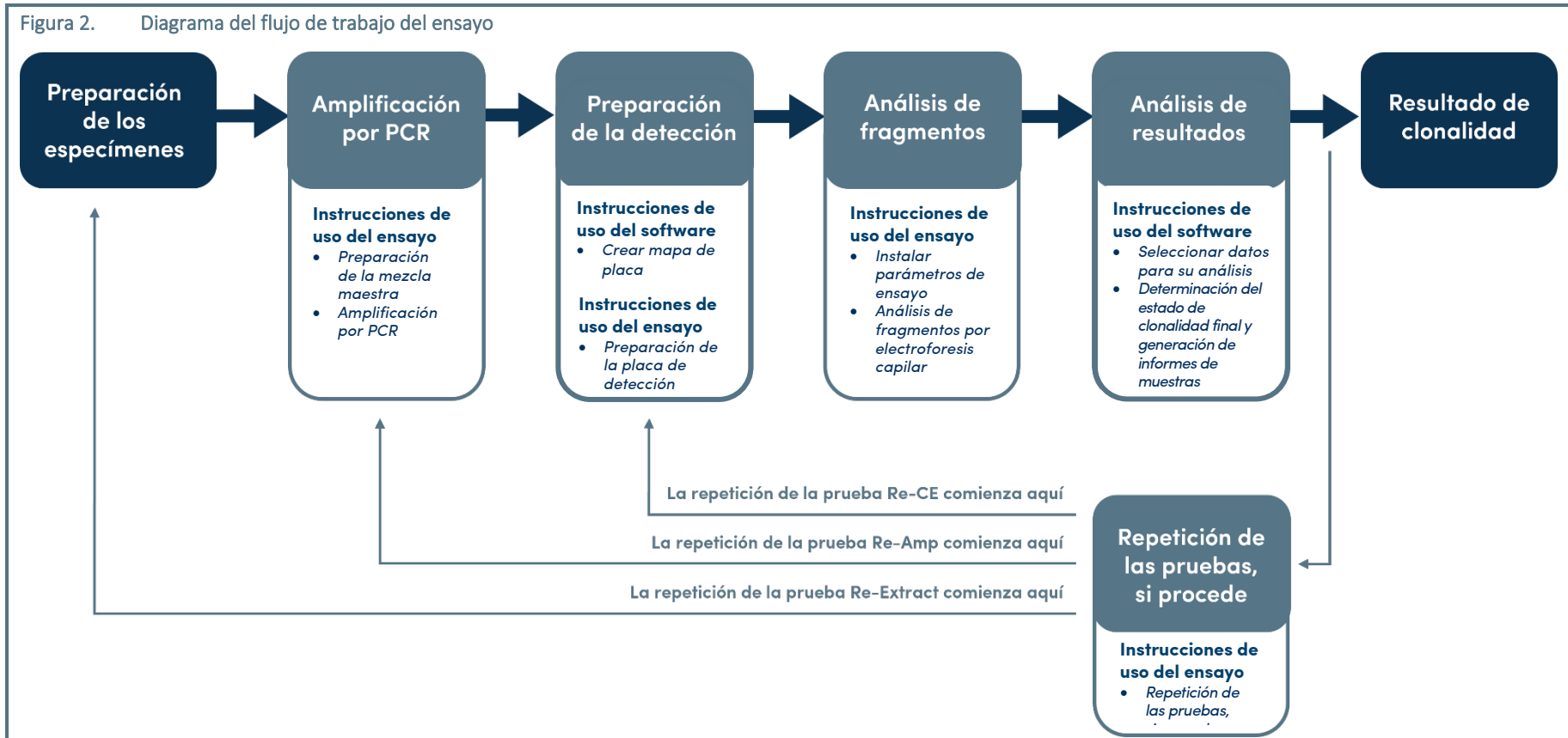
- 7.4.1. Extraiga el ADNg de los especímenes <7 días después de la recogida.
- 7.4.2. Cuantifique el ADNg extraído utilizando un espectrofotómetro UV-Vis de microvolúmenes.
- 7.4.3. Prepare una dilución de ADNg en 50 ng/μl con 1/10 de TE.
  - 7.4.3.1. Para la amplificación con cada mezcla maestra, se requieren 5 μl de ADNg a una concentración de 50 ng/μl.
    - Prepare al menos 15 μl - 20 μl de ADNg diluido.
  - 7.4.3.2. Si la concentración de ADNg disponible es <50 ng/μl, vuelva a extraer los especímenes de pacientes.

### 7.5. Conservación de las muestras

- 7.5.1. Conserve el ADNg hasta 7 días entre 2 °C y 8 °C antes de su uso o hasta 3 años entre -30 °C y -15 °C antes de su uso.
- 7.5.2. Almacene las muestras de ADNg diluidas en tubos de unión baja.

## 8. Procedimiento de la prueba

Nota: Este ensayo requiere el uso de este documento junto con las instrucciones de uso del IdentiClone Dx IGH Software.



## 8.1. Preparación de la mezcla maestra

- Incluya controles de desarrollos (controles positivos, negativos y en blanco) en cada análisis.
- Se requiere una réplica de la muestra para el análisis con cada mezcla maestra.

- 8.1.1. Retire la mezcla maestra (o mezclas maestras), el control positivo, el control negativo, el CB y la muestra de ADN<sub>g</sub> diluida (50 ng/μl) de su lugar de conservación y deje que el tubo (o los tubos) se descongele completamente a temperatura ambiente; a continuación, agite en el agitador vórtex a velocidad máxima durante aproximadamente 15 segundos.
- 8.1.2. Retire la ADN polimerasa Taq de su lugar de conservación y manténgala fría (es decir, sobre hielo o sobre una placa de frío).

### ¡IMPORTANTE! NO agite en vórtex el tubo de enzima ADN polimerasa Taq.

- 8.1.2.1. Centrifugue los tubos durante 2 a 5 segundos en una microcentrifugadora.

**Nota:** Se requieren pasos de centrifugación para recoger todo el líquido en el fondo de un tubo o pocillo de placa. Pueden utilizarse velocidades y tiempos aproximados si el usuario confirma visualmente que la recogida se ha realizado correctamente. Las velocidades y duraciones indicadas se incluyen como recomendación.

- 8.1.3. Siga las directrices siguientes para calcular el número total de reacciones (N) para cada mezcla maestra:
- Incluya al menos un volumen de reacción adicional para tener en cuenta el error de pipeteado.

n	n.º de muestras
+ 1	ADN de control positivo (IGH POS (+))
+ 1	ADN de control negativo (NEG (-))
+ 1	Control en blanco (CB)
+ 1	volumen de reacción adicional
<b>N = (n + 4)</b>	<b>n.º de muestras + 3 controles + 1 volumen de reacción adicional</b>

- 8.1.3.1. Añada el volumen calculado para cada mezcla maestra en tubos independientes etiquetados, utilizando **N × 45 μl**.
- 8.1.3.2. Añada el volumen calculado de ADN polimerasa Taq a cada mezcla maestra, utilizando **N × 0,25 μl**.
- 8.1.3.3. Agite la mezcla maestra + solución(es) de ADN polimerasa Taq a velocidad máxima durante 5 a 15 segundos.
- NO agite en vórtex la ADN polimerasa Taq antes de añadirla a cada mezcla maestra. Agite en vórtex únicamente después de la formulación con la mezcla maestra.
- 8.1.3.4. Con una microcentrifugadora, centrifugue los tubos entre 2 y 5 segundos.
- 8.1.4. Para cada reacción, combine 45 μl de MM + solución(es) de ADN polimerasa Taq con 5 μl de plantilla (muestra de ADN<sub>g</sub> diluida en 50 ng/μl, control positivo, control negativo o CB) en pocillos individuales adecuados de una placa o tubo(s) de PCR.
- 8.1.4.1. Pipetee varias veces y, a continuación, cierre el tubo o selle la placa con tiras de tapa o láminas adhesivas de sellado; O
- 8.1.4.2. Cierre el tubo o selle la placa con tiras de tapa o láminas adhesivas de sellado; a continuación, agite en vórtex a velocidad máxima durante aproximadamente 15 segundos.
- 8.1.4.3. Si utiliza un tubo de PCR, utilice una microcentrifugadora para centrifugar el tubo (o tubos) durante 2 a 5 segundos. Si está utilizando una placa de PCR, centrifugue la placa a 1000 RCF durante aproximadamente 30 segundos.

## 8.2. Amplificación por PCR

- 8.2.1. Amplifique el tubo (o las placas) o la placa de acuerdo con los parámetros de PCR indicados en la Tabla 6.
- 8.2.1.1. Asegúrese de que el valor del *Reaction Volume (Volumen de reacción)* sea de **50 µl** y de que la *Cover Temperature (Temperatura de la cubierta)* sea de **105 °C**.
- 8.2.1.2. Asegúrese de que el valor del *Reaction Volume (Volumen de reacción)* sea de **50 µl** y de que la *Cover Temperature (Temperatura de la cubierta)* sea de **105 °C**.
- 8.2.2. Una vez terminado el programa de PCR, extraiga la placa o tubos de amplificación del termociclador.
- 8.2.2.1. Los productos de PCR pueden conservarse a una temperatura de 2 °C a 8 °C durante un máximo de 7 días, o a una temperatura de -30 °C a -15 °C durante un máximo de 3 meses antes de la detección.
- 8.2.2.2. Siga la sección *Crear mapa de placa* de las instrucciones de uso del software para crear un mapa de placa antes de pasar a la sección 8.3.

**Tabla 6. Parámetros de PCR**

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Velocidad de la rampa
1	95 °C	7 minutos	1	75 %
2	95 °C	45 segundos	35	
3	60 °C	45 segundos		
4	72 °C	90 segundos		
5	72 °C	10 minutos	1	
6	15 °C	∞	Mantener	

## 8.3. Preparación de la placa de detección

**Nota:** Asegúrese de que el mapa de placa se haya creado según la sección *Crear mapa de placa* de las instrucciones de uso del software.

- 8.3.1. Deje que se descongele un número adecuado de tubos de Hi-Di Formamide a temperatura ambiente.
- El tamaño unitario de Hi-Di Formamide, 3500 Dx Series es de 5 ml.

**Nota:** Para evitar ciclos de congelación/descongelación, la Hi-Di Formamide puede descongelarse, mezclarse y dividirse en alícuotas en tubos de 2 ml a un volumen de 1 ml y almacenarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 8.3.2. Saque un tubo del patrón de tamaño LIZ v2.0 Dx del lugar de conservación.
- 8.3.3. Agite en vórtex tanto la Hi-Di Formamide como el patrón de tamaño LIZ a la velocidad máxima durante 5 a 15 segundos.
- 8.3.4. Centrifugue los tubos aproximadamente de 2 a 5 segundos.
- 8.3.5. En un nuevo tubo adecuado para el volumen, combine la cantidad necesaria de Hi-Di Formamide con los patrones de tamaño LIZ.
- 8.3.5.1. La proporción final debe ser de **0,056** (56 µl de patrón de tamaño LIZ + 1000 µl de Hi-Di Formamide).
- Asegúrese de que el volumen de solución LIZ:Hi-Di sea suficiente para dividir en alícuotas de 19 µl por reacción.
- 8.3.5.2. Agite la solución en el agitador vórtex a la velocidad máxima durante 5 a 15 segundos y, a continuación, centrifugue durante 2 a 5 segundos.
- 8.3.6. Centrifugue la placa o los tubos de amplificación de la sección 8.2.2 a 1000 RCF durante 30 segundos.
- 8.3.7. En una nueva placa de PCR de 96 pocillos, combine 19 µl de solución LIZ:Hi-Di con 1 µl de producto de PCR por pocillo.
- Verifique que solo haya un tipo de plantilla de reacción (*esto es*, muestra, control positivo, control negativo, control en blanco) por pocillo.
- 8.3.8. Añada 20 µl de Hi-Di Formamide a cualquier pocillo vacío dentro de la inyección de 24 pocillos.
- Cada inyección en el instrumento ABI 3500xL Dx o ABI 3500xL Genetic Analyzer evalúa 24 pocillos a la vez.
- 8.3.9. Mezcle la placa de detección de una de estas dos maneras:

- 8.3.9.1. Pipetee hacia arriba y hacia abajo varias veces y, a continuación, selle la placa con tiras de tapa o lámina adhesiva de sellado; **Q**
- 8.3.9.2. Selle la placa con tiras de tapa o lámina adhesiva de sellado y, a continuación, agite en el agitador vórtex a velocidad máxima durante 15 segundos.
- 8.3.9.3. Centrifugue la placa a 1000 RCF durante 30 segundos.
- 8.3.9.4. Desnaturalice la placa de detección utilizando los parámetros de la Tabla 7 en el termociclador.

**Nota:** Consulte el apartado 8.3.1 para confirmar que los volúmenes de reactivo ABI son suficientes para el desarrollo.

**Tabla 7. Parámetros de desnaturalización**

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Velocidad de la rampa
1	95 °C	3 minutos	1	75 %
2	4 °C	5 minutos	1	

- 8.3.9.5. Asegúrese de que el valor del *Reaction Volume (Volumen de reacción)* sea de **20 µl** y de que la *Cover Temperature (Temperatura de la cubierta)* sea de **105 °C**.
- 8.3.10. Inicie el desarrollo.
  - 8.3.10.1. Una vez finalizado el programa de desnaturalización, retire la placa de detección del termociclador y centrifugue la placa a 1000 RCF durante 30 segundos.

## 8.4. Instalar parámetros de ensayo

Los parámetros del ensayo pueden importarse del archivo ***IGH IP.xml*** suministrado, incluido en el paquete IdentiClone Dx IGH Software (REF 91010111) y requiere la *biblioteca de IVD 3 del software de recogida de datos ABI 3500 Dx Series*.

- Nota:** La sección 8.4 es necesaria para el primer uso de este ensayo con cualquier instrumento ABI.
- Nota:** Confirme que los parámetros del ensayo estén configurados correctamente antes de pasar al apartado 8.5.

**¡IMPORTANTE!** Los parámetros del instrumento y protocolo de asignación de tamaños determinarán cómo se procesarán las muestras (es decir, análisis de fragmentos). Es esencial asegurarse de que se guarden los parámetros correctos con el nombre del ensayo correcto (***IGH Instrument Parameters [Parámetros del instrumento de IGH]***) para la ejecución correcta del ensayo.

- 8.4.1. Importe los parámetros del instrumento del IdentiClone Dx IGH Assay en el instrumento ABI.
  - 8.4.1.1. Haga doble clic en el icono **ABI 3500 Dx** para abrir el software de recogida de datos 3 IVD de 3500 Dx Series.
    - 8.4.1.1.1. En el menú del panel, haga clic en **Library (Biblioteca)** ().
    - 8.4.1.1.2. Haga clic en **Manage (Gestionar)** () y, a continuación, seleccione **Assays (Ensayos)** en el menú desplegable.
      - 8.4.1.1.2.1. Seleccione el icono **Import (Importar)** () , navegue hasta la ruta de archivo del paquete de software y seleccione ***IGH-IP.xml***.
- 8.4.2. Importe la convención de nombres de archivos del IdentiClone Dx IGH Assay en el instrumento ABI.
  - 8.4.2.1.1. Haga clic en **Manage (Gestionar)** () y, a continuación, seleccione **File Name Convention (Convención del nombre de archivo)** en el menú desplegable.
    - 8.4.2.1.1.1. Seleccione el icono **Import (Importar)** () , desplácese hasta la ruta de archivo del paquete de software y seleccione ***IGH-FNC.xml***.
- 8.4.3. Importe el grupo de resultados del IdentiClone Dx IGH Assay en el instrumento ABI.
  - 8.4.3.1.1. Haga clic en **Manage (Gestionar)** () y, a continuación, seleccione **Results Group (Grupo de resultados)** en el menú desplegable.
    - 8.4.3.1.1.1. Seleccione el icono **Import (Importar)** () , desplácese hasta la ruta de archivo del paquete de software y seleccione ***IGH-RG.xml***.

8.4.4. Verifique que los parámetros adecuados del *Instrument Protocol (Protocolo del instrumento)* (Figura 3) y del *Sizecalling Protocol (Protocolo de asignación de tamaños)* (Figura 4) estén correctamente configurados y guardados en la biblioteca de ensayos del software de recogida de datos ABI 3500.

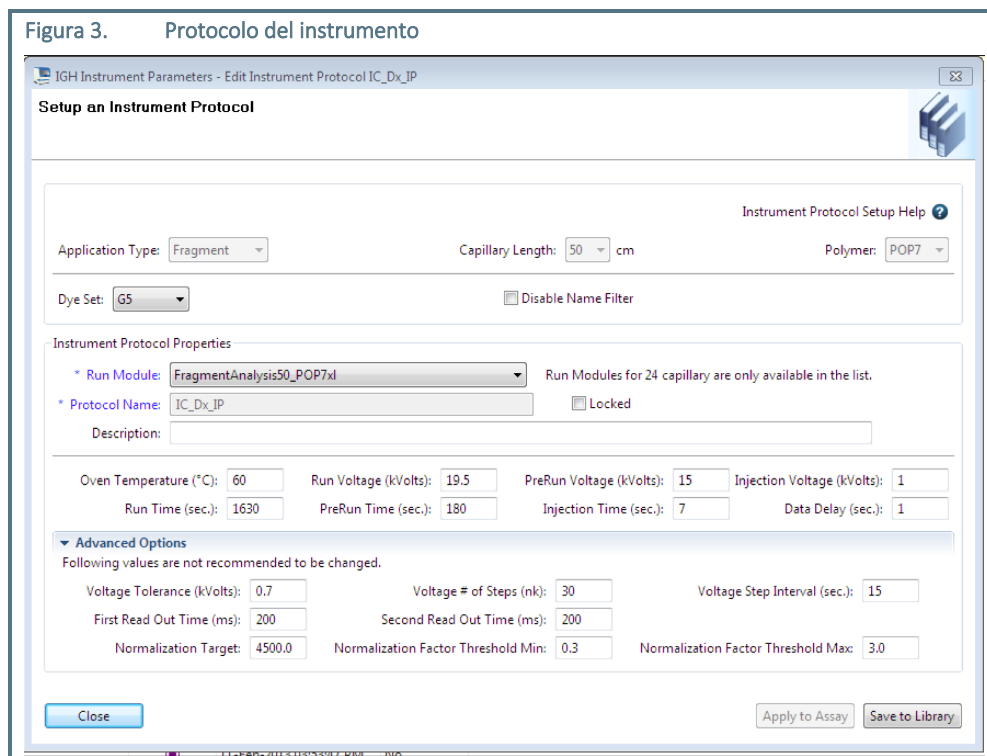
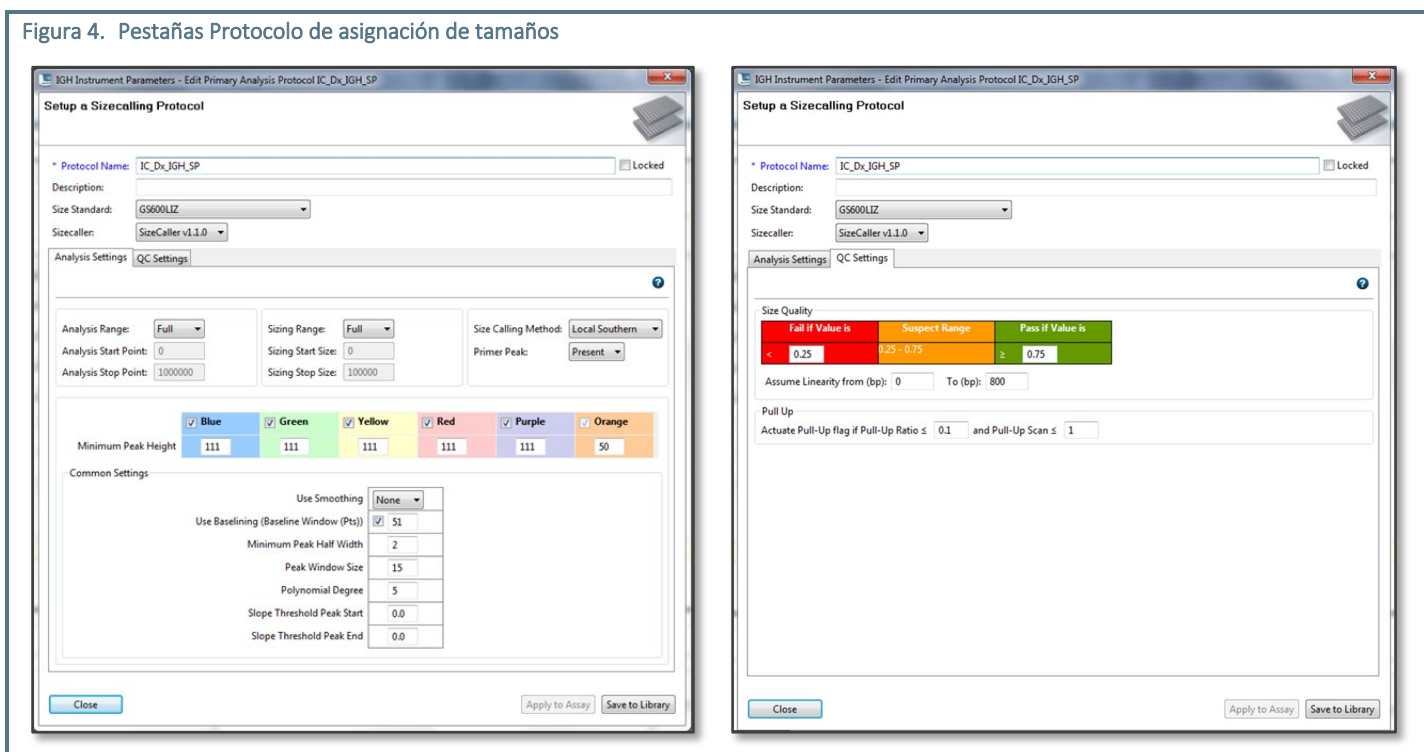
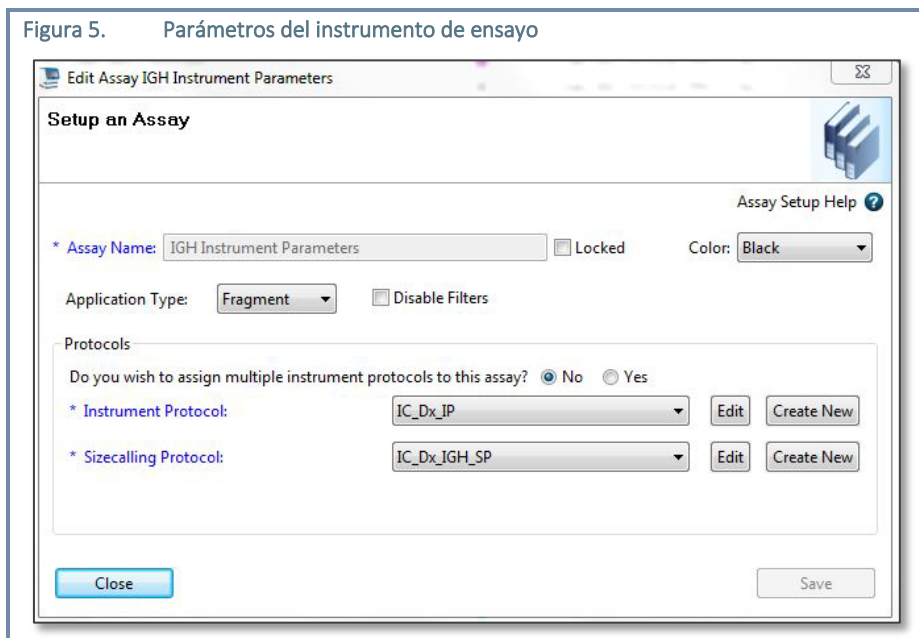



Figura 4. Pestañas Protocolo de asignación de tamaños

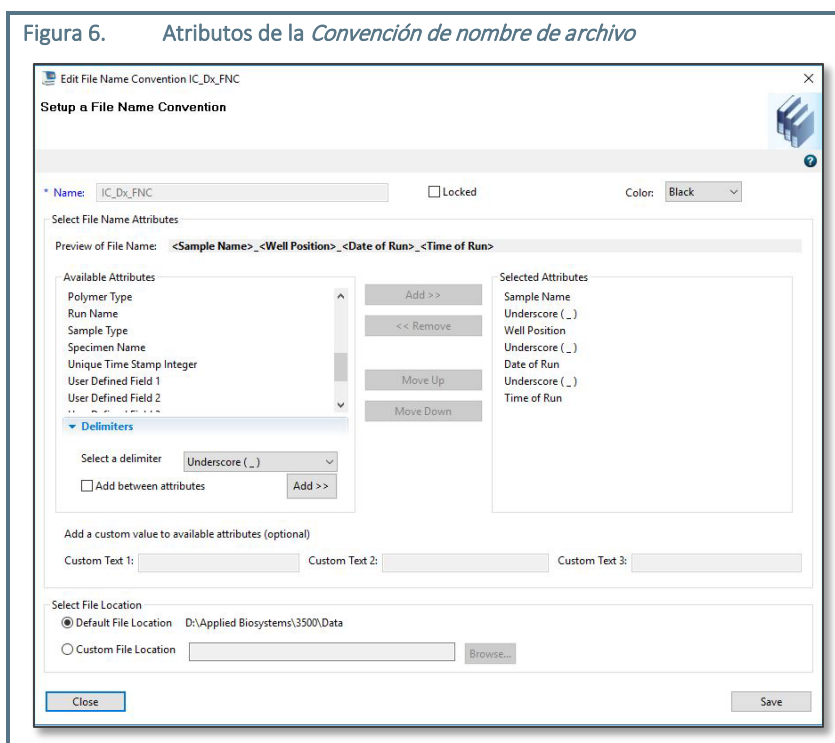


- 8.4.4.1. Guarde los parámetros del ensayo en la biblioteca del ensayo ABI 3500 Dx utilizando el nombre **IC\_Dx\_IP** para el protocolo del instrumento e **IC\_Dx\_IGH\_SP** para el protocolo de asignación de tamaños, **exactamente** como se muestra en la Figura 5.



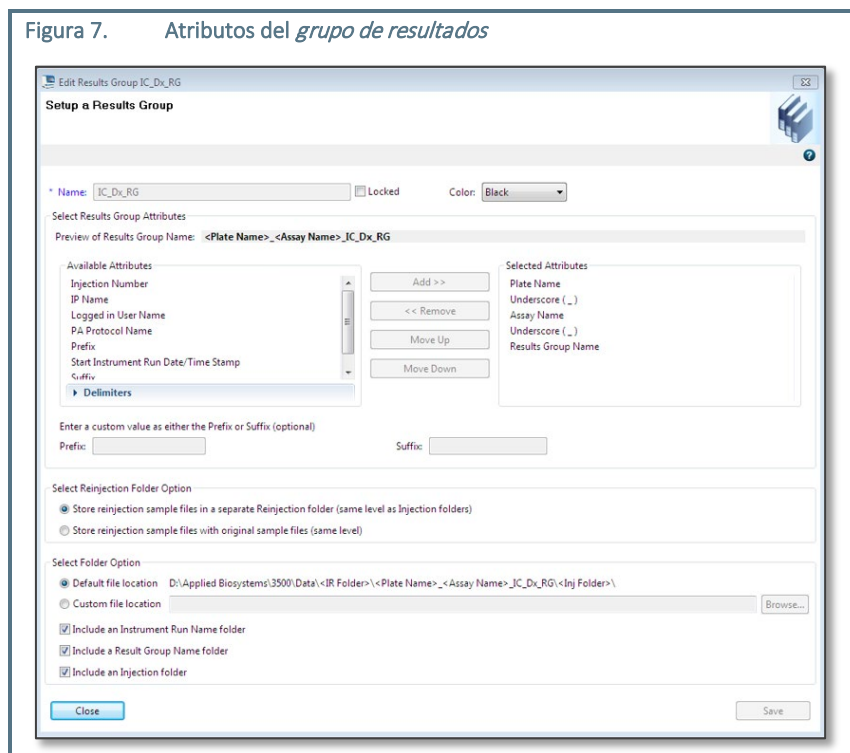
- 8.4.4.2. En la sección **File Name Conventions (Convenciones de nombre de archivo)**, haga clic en el icono del lápiz  para asegurarse de que la configuración de la convención de nombre de archivo (CNA) coincida con las de la Figura 6 y se guarde como **IC\_Dx\_FNC** (exactamente como se muestra).
  - 8.4.4.2.1. La CNA determina qué campos de datos y en qué orden contendrán los archivos de datos resultantes (archivos FSA).
  - 8.4.4.2.2. Verifique que los atributos seleccionados coinciden con el orden mostrado en la Figura 6.

**IMPORTANTE:** **Confirme que el campo Sample Name (Nombre de la muestra) está en primer lugar en la lista de Selected Attributes (Atributos seleccionados).**



- 8.4.5. En la sección *Results Group (Grupo de resultados)*, haga clic en el icono del **lápiz** para asegurarse de que los ajustes del *Results Group (Grupo de resultados)* (RG) coinciden con los de la Figura 7 y se guardan como **IC\_Dx\_RG (exactamente)** como se muestra).
- 8.4.5.1. El grupo de resultados se utiliza para asignar un nombre, ordenar y personalizar las carpetas en las que se almacenan los archivos de datos de muestras.
- 8.4.5.2. Verifique que los atributos seleccionados coinciden con el orden mostrado en la Figura 7.

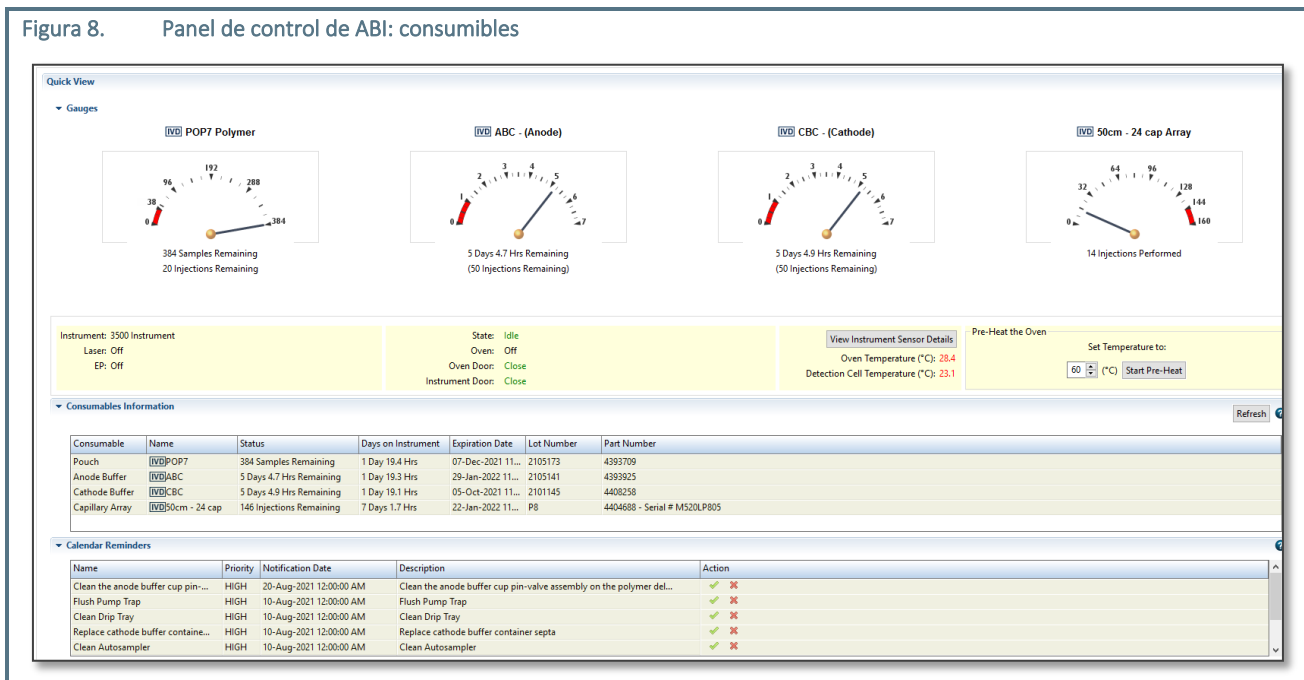
**IMPORTANTE:** **Configure correctamente la convención de nombre de archivo y el grupo de resultados como se indicó anteriormente para evitar errores en el análisis de datos.**



## 8.5. Análisis de fragmentos por electroforesis capilar

- 8.5.1. Revise el estado de los consumibles del instrumento.
- 8.5.1.1. En el panel del instrumento ABI, haga clic en **Refresh (Actualizar)** y, a continuación, revise el tiempo restante del instrumento y el número de inyecciones realizadas para los consumibles (Figura 8) y verifique lo siguiente:
- 8.5.1.1.1. Volúmenes suficientes de reactivo ABI para el ensayo(s) de electroforesis capilar (EC),
- 8.5.1.1.2. Los amortiguadores, el polímero y los capilares no han superado el tiempo máximo permitido en el instrumento,
- 8.5.1.1.3. El número de inyecciones restantes para cada componente es suficiente para el número de inyecciones necesarias para el desarrollo o desarrollos de EC, y
- 8.5.1.1.4. El POP7 restante es suficiente para el número de muestras en el desarrollo o desarrollos.
- 8.5.1.2. Si un consumible ha caducado o ha de sustituirse, siga las instrucciones del fabricante para realizar el mantenimiento necesario antes de continuar.

Figura 8. Panel de control de ABI: consumibles



8.5.1. Importe el mapa de placa completado ABI (CSV) creado con el IdentiClone Dx IGH Software (consulte la sección *Crear mapa de placas* en las instrucciones de uso del software).

**¡IMPORTANTE!** Asegúrese de que se creó un archivo LIVS cuando se generó el mapa de placa. Si falta el archivo LIVS, el IdentiClone Dx IGH Software NO podrá realizar el análisis de resultados.

- 8.5.1.1. Haga clic en **Create New Plate (Crear placa nueva)** e introduzca un nombre para la placa.
- 8.5.1.2. Seleccione **96** como *Number of Wells (Número de pocillos)*.
- 8.5.1.3. Seleccione **Fragment (Fragmento)** como *Plate Type (Tipo de placa)*.
- 8.5.1.4. Seleccione **50 cm** como *Capillary Length (Longitud del capilar)*.
- 8.5.1.5. Seleccione **POP7** como *Polymer Type (Tipo de polímero)*.
- 8.5.1.6. Haga clic en **Assign Plate Contents (Asignar el contenido de la placa)**.
- 8.5.1.7. Haga clic en **Import (Importar)**.

8.5.2. Compruebe que se han importado los atributos correctos del mapa de placa.

- 8.5.2.1. Abra el mapa de placa (CSV) de ABI creado con el IdentiClone Dx IGH Software
  - 8.5.2.1.1. Verifique que todos los pocillos de muestras y controles estén correctamente nombrados y que cada pocillo tenga asignado el *Assay (Ensayo)*, la *File Name Convention (Convención de nombre de archivo)* y el *Results Group (Grupo de resultados)* correctos (consulte las secciones 8.4.5 y 8.4.3, respectivamente).
- 8.5.2.2. Si el mapa de placa no coincide con la configuración prevista, genere un nuevo archivo de mapa de placa ABI comenzando en el apartado 8.5.1.

**¡IMPORTANTE!** NO modifique el mapa de placa con el ABI Genetic Analyzer. Utilice el software para modificar el mapa de placa y asegurarse de que también se actualiza el archivo LIVS asociado.

**Si los archivos de mapa de placa y LIVS están desalineados, el software NO podrá realizar el análisis de resultados.**

- 8.5.2.3. Seleccione cualquier pocillo que no contenga una reacción (muestra o control), *haga clic con el botón derecho* y seleccione **delete (eliminar)** para evitar la generación de resultados.

**Nota:** Si no se completa este paso, pueden producirse errores de CT o daños en el capilar.

- 8.5.2.4. Haga clic en **Save Plate (Guardar placa)** y, a continuación, haga clic en **Link Plate for Run (Vincular placa para desarrollo)**.

- 8.5.3. Desarrolle la placa en el instrumento ABI 3500xL Dx o ABI 3500xL Genetic Analyzer.
- 8.5.3.1. Cargue la placa de detección adecuada (preparada en el apartado 8.3) en el instrumento ABI siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 8.5.3.1.1. Compruebe que todos los pocillos ocupados de la placa de detección no contengan burbujas de aire y que el contenido esté en el fondo del pocillo.
- 8.5.3.1.2. Compruebe que la orientación de la placa sea correcta cuando se coloque en el instrumento.
- 8.5.3.1.3. Compruebe que la posición de la placa en el instrumento ABI esté seleccionada correctamente (placa A frente a placa B).
- 8.5.3.2. Haga clic en **Start Run (Iniciar desarrollo)**.
- El instrumento realizará la inicialización y, si se superan todas las comprobaciones de control de calidad interno, comenzará el desarrollo.
- 8.5.3.2.1. Asegúrese de que haya comenzado el desarrollo; verifique que el fondo del conjunto de muestras en la primera inyección en la visualización de la placa se vuelva verde.
- 8.5.4. Preparar los datos del desarrollo para su análisis
- 8.5.4.1. Después del desarrollo ABI, verifique que este se ha completado sin errores y, a continuación, desplácese hasta la ubicación del archivo que contiene los resultados del análisis en formato FSA.
- La ubicación del archivo FSA la determina el *Results Group (Grupo de resultados)*, guardado en la sección 8.4.1, Figura 5.
- 8.5.4.1.1. Copie los archivos FSA en la misma ubicación que contiene los archivos LIVS generados por el software.
- La ubicación del archivo LIVS se especifica durante la *Configuración de la placa* (consulte las instrucciones de uso del software) en el momento en que se guardó el mapa de placa.
- 8.5.4.1.2. Proceda al análisis de datos con el IdentiClone Dx *IGH* Software; consulte el apartado *Análisis de resultados* en las instrucciones de uso del software correspondiente.
- 8.5.4.2. Retire la placa de la base del instrumento ABI y deséchela.

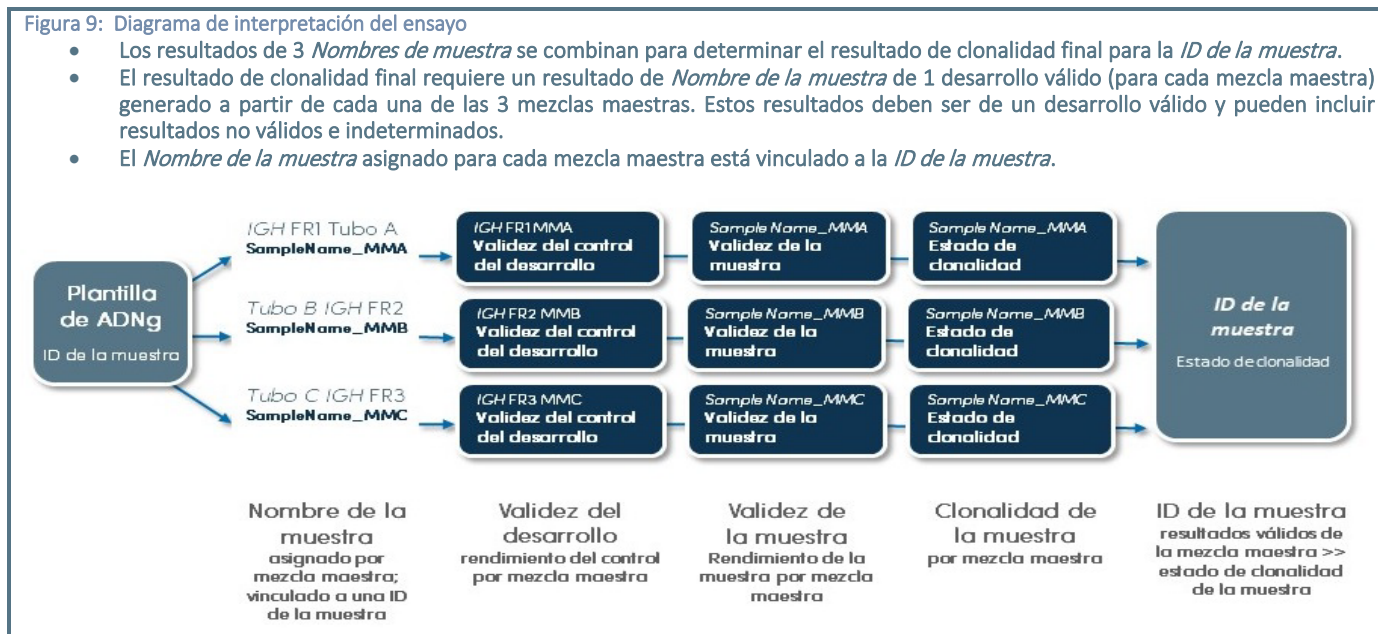
## 8.6. Control de calidad

El kit incluye controles positivos, negativos y en blanco, que deben incluirse cada vez que se realice el ensayo. Los datos generados por el ensayo serán interpretados por el IdentiClone Dx *IGH* Software, tal como se describe en la sección 9.

## 9. Interpretación de los resultados

### 9.1. Puntos de comprobación del software

El IdentiClone Dx IGH Software interpreta los datos generados por el instrumento ABI siguiendo una lógica predeterminada que requiere puntos de comprobación de validez para continuar con el paso de análisis posterior (consulte la Figura 9). El estado de clonalidad de la muestra (es decir, resultado de *ID de la muestra*) requiere al menos un resultado de un desarrollo válido para cada mezcla maestra (es decir, resultados de *Nombre de la muestra*).



9.1.1. Los controles del desarrollo se evalúan para determinar su validez.

9.1.1.1. Un estado de desarrollo válido requiere los 3 tipos de controles de ciclo (positivo, negativo y en blanco) para generar resultados válidos; de lo contrario, el estado del desarrollo será no válido.

9.1.1.2. Todos los resultados del *Nombre de la muestra* incluidos en un desarrollo no válido se considerarán automáticamente no válidos y no se realizará el análisis.

**¡IMPORTANTE!** Solo los desarrollos válidos, que requieren que los 3 controles sean válidos, pasarán al siguiente paso.

9.1.2. Se evalúa la validez de los resultados del *Nombre de la muestra* de un desarrollo válido (para cada mezcla maestra).

9.1.2.1. Un resultado no válido del *Nombre de la muestra* no continuará con el análisis posterior (es decir, el estado de clonalidad de la mezcla maestra).

9.1.3. Los resultados válidos del *Nombre de la muestra* se evalúan para determinar la clonación (para cada mezcla maestra).

9.1.3.1. Clonal

9.1.3.2. No clonal

9.1.3.3. Indeterminado

9.1.4. Los resultados válidos del *Nombre de la muestra* para las 3 mezclas maestras se evalúan para determinar el estado de clonalidad de la muestra (resultado de *ID de la muestra*); consulte la Figura 10.

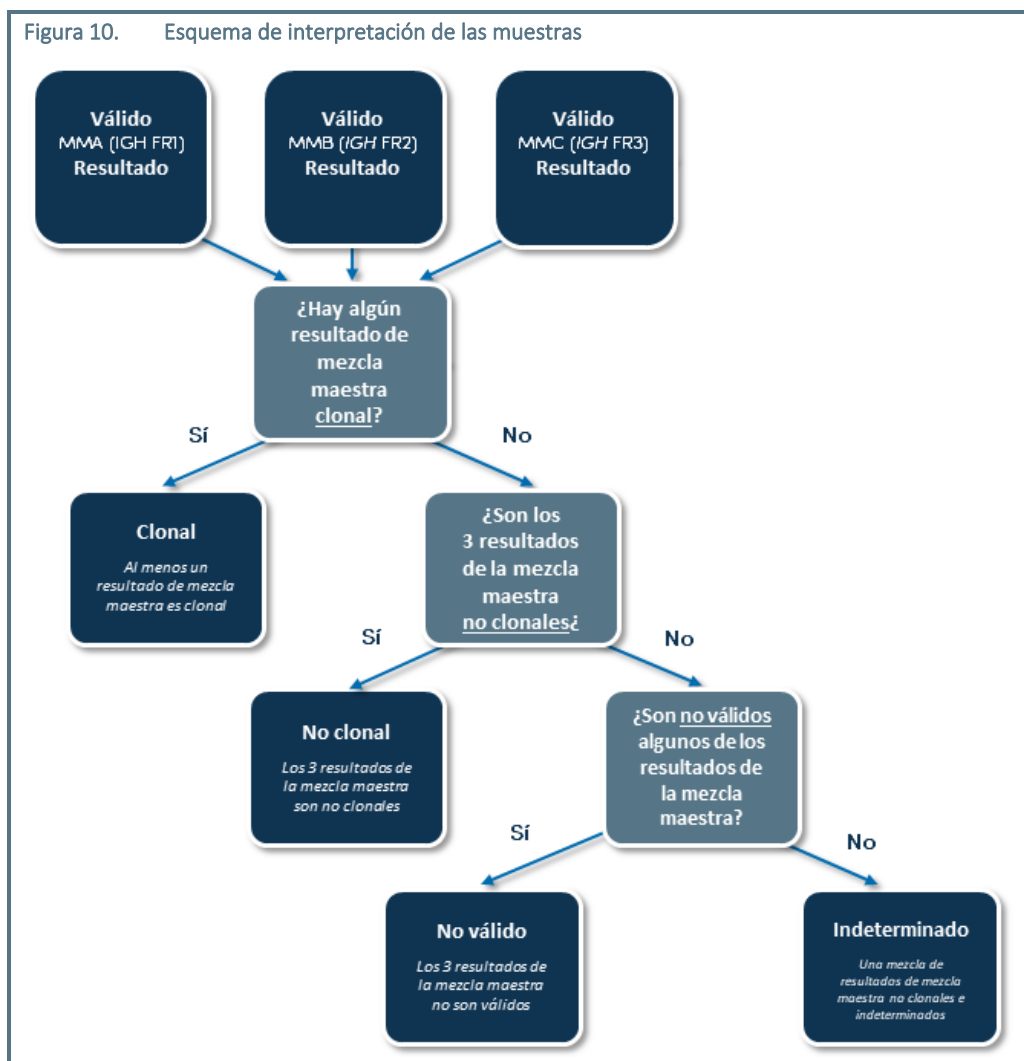
9.1.4.1. Si uno o más resultados de *Sample Name (Nombre de la muestra)* (o mezcla maestra de muestra) son Clonal, el resultado de *Sample ID (ID de la muestra)* es **Clonal**.

9.1.4.2. Si todos los resultados de *Sample Name (Nombre de la muestra)* (o mezcla maestra de la muestra) son No clonales, el resultado de *Sample ID (ID de la muestra)* es **No clonal**.

9.1.4.3. Si los resultados de *Sample Name (Nombre de la muestra)* (o mezcla maestra de la muestra) son una mezcla de resultados Indeterminados y No clonales, el resultado de la *Sample ID (ID de la muestra)* es **Indeterminado**.

9.1.4.4. Si un resultado de *Sample Name (Nombre de la muestra)* (o mezcla maestra de muestra) no es válido y otros resultados son No clonal o Indeterminado, el resultado de *Sample ID (ID de la muestra)* es **No válido**.

9.1.4.4.1. Los resultados no válidos del *Sample Name (Nombre de la muestra)* (o de la mezcla maestra de la muestra) de un desarrollo válido pueden volverse a analizar según el apartado 10 para resolver el estado de clonalidad de la *Sample ID (ID de la muestra)*.



## 10. Repetición de las pruebas, si procede

### 10.1. Desarrollos no válidos

- 10.1.1. Un desarrollo en el que cualquiera de los controles no cumple los criterios de validez es un **Invalid Run (Desarrollo no válido)**. Repita el desarrollo, incluidas todas las muestras, el control positivo, el control negativo y el CB. Cada mezcla maestra se desarrolla de forma independiente.
- 10.1.2. Repita el desarrollo de acuerdo con las instrucciones de uso del software asociado, basándose en el código o códigos de error indicados en el informe de desarrollo del IdentiClone Dx IGH Software.

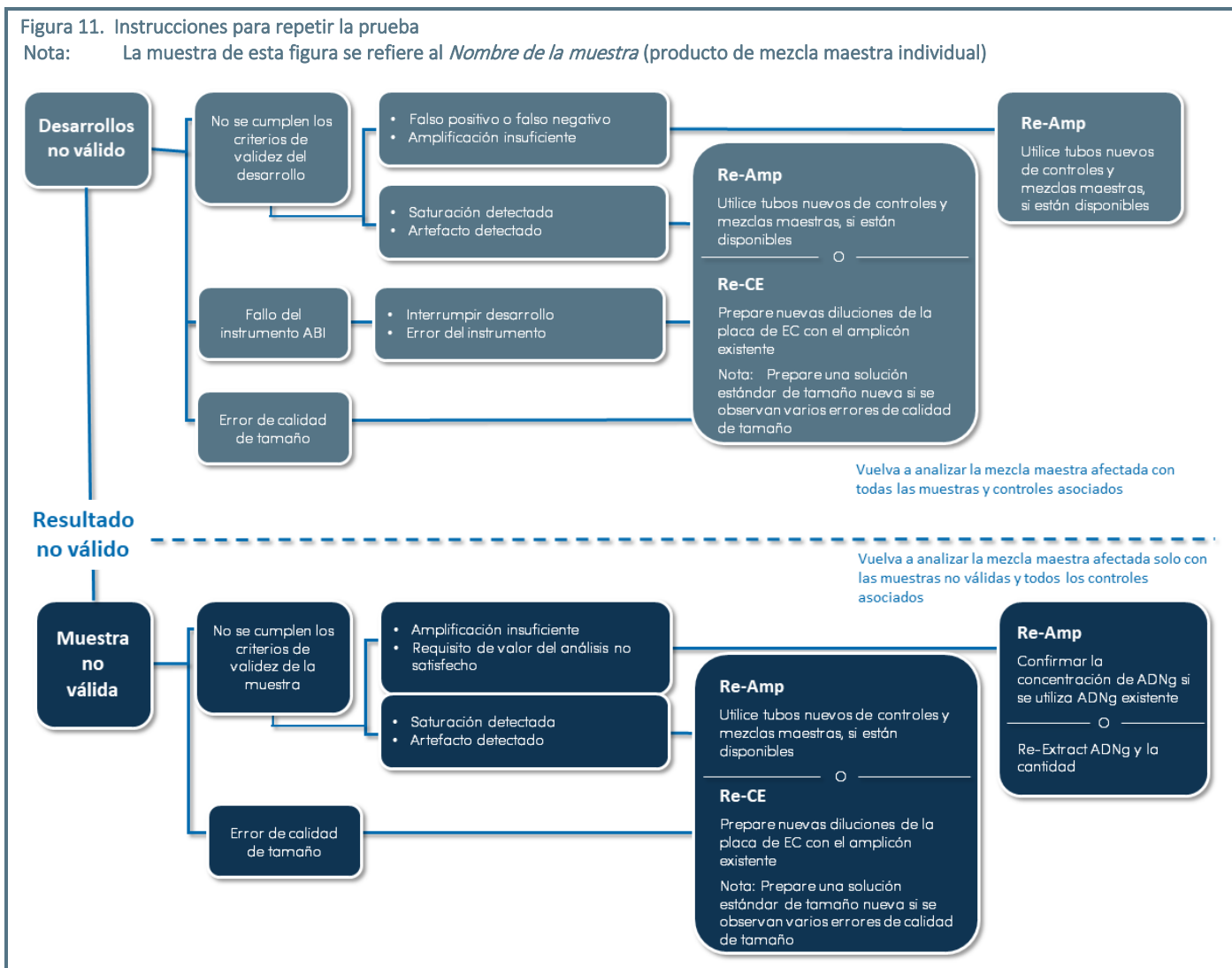
### 10.2. Muestras no válidas en un desarrollo válido

Los resultados no válidos del *Nombre de la muestra* generados a partir de un desarrollo válido requieren repetir la prueba si los resultados del *Nombre de la muestra* de las otras mezclas maestras incluyen resultados no clonales o indeterminados; de lo contrario, no es necesario repetir la prueba. Consulte la Figura 11 para ver la jerarquía de repetición de la prueba.

- 10.2.1. Si los resultados de cualquiera de las mezclas maestras son **Clonal** (en un desarrollo válido), no es necesario repetir la prueba.
- 10.2.2. Si los resultados de todas las mezclas maestras son **No clonal** (en desarrollos válidos), no es necesario repetir la prueba.
- 10.2.3. Si los resultados de todas las mezclas maestras son **No Clonal**, **Indeterminado** y **No válido**, vuelva a analizar el *Nombre(s) de la muestra* con el resultado no válido y los controles del desarrollo asociados de acuerdo con el código de error (consulte la Figura 11).

### 10.3. Códigos de error y repetición de la prueba

Se permiten hasta cuatro eventos de repetición de la prueba cuando los fallos se deben a causas diferentes (es decir, resultado de *Nombre de la muestra* ⇒ no válido en la 1ª ronda debido a un desarrollo no válido; resultado de *Nombre de la muestra* ⇒ no válido en la 2ª ronda debido a un artefacto; resultado de *Nombre de la muestra* ⇒ no válido en la 3ª ronda debido a una saturación; resultado de *Nombre de la muestra* ⇒ no válido en la 4ª ronda debido a un error de CT).



## 11. Limitaciones del procedimiento

- Límite de detección: 2,5 % de clonalidad de células B
- Este ensayo no identifica el 100 % de las poblaciones de células clonales.
- Interprete los resultados de las pruebas de clonalidad molecular en el contexto de los datos clínicos, histológicos e inmunofenotípicos disponibles.
- Las pruebas de tipo PCR están sujetas a interferencia por degradación del ADN o inhibición de la PCR por EDTA, heparina u otros compuestos.

## 12. Eficacia diagnóstica

### 12.1. Validaciones de muestras y especímenes: estabilidad de los especímenes

12.1.1. Este estudio proporciona una evaluación de validez del tipo de muestra para respaldar las afirmaciones propuestas sobre las instrucciones de uso; el dispositivo en investigación está validado para sangre periférica anticoagulada con EDTA. La finalidad de este estudio es determinar la estabilidad de la sangre periférica anticoagulada con EDTA para el IdentiClone Dx IGH Assay, proporcionando pruebas objetivas de los especímenes analizados antes y después de diversas condiciones de conservación con el dispositivo en investigación en comparación con los resultados de las pruebas de referencia específicas de los especímenes. Este estudio se llevó a cabo en 2 réplicas de 15 especímenes (10 clonales/positivos de células B, 5 no clonales/negativos) analizados en 5 puntos temporales diferentes con 1 lote de reactivos, en varios instrumentos ABI 3500xL Dx, por varios operadores durante varios días. Los puntos temporales analizados incluyen:

- Punto temporal 0: Referencia
- Punto temporal 1: Refrigerado (2-8 °C) durante 5 días
- Punto temporal 2: Refrigerado (2-8 °C) durante 7 días
- Punto temporal 3: Temperatura ambiente (15-30 °C) durante 5 días
- Punto temporal 4: Temperatura ambiente (15-30 °C) durante 7 días

12.1.2. Tabla 8 proporciona el resultado de la prueba para cada réplica analizada de los 15 especímenes. Todos los resultados del análisis de muestras (2 réplicas para cada uno de los 15 especímenes) fueron válidos (tasa de validez de la muestra del 100,0 %, 30/30). Ambas réplicas de cada espécimen no clonal y clonal generaron los resultados esperados, lo que indica una concordancia del 100,0 % entre el punto temporal 0 frente al punto temporal 1, punto temporal 0 frente al punto temporal 2, punto temporal 0 frente al punto temporal 3 y el punto temporal 0 frente al punto temporal 4.

**Tabla 8. Resumen de resultados de estado de clonalidad**

ID del sujeto	Réplica	Estado de clonalidad				
		Punto temporal 0	Punto temporal 1	Punto temporal 2	Punto temporal 3	Punto temporal 4
CS189	1	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal
	2	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal
030723-1	1	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal
	2	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal
030723-2	1	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal
	2	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal
041223-4	1	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal
	2	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal
CS231	1	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal
	2	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal	No clonal
CS201	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
DLS08	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
DLS09	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
DLS10	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
DLS11	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
DLS12	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
DLS13	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal

Tabla 8. Resumen de resultados de estado de clonalidad

ID del sujeto	Réplica	Estado de clonalidad				
		Punto temporal 0	Punto temporal 1	Punto temporal 2	Punto temporal 3	Punto temporal 4
DLS14	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
DLS15	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
DLS16	1	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal
	2	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal	Clonal

- 12.1.2.1. Los resultados de este estudio han establecido que la estabilidad de la sangre periférica anticoagulada con EDTA para uso con el IdentiClone Dx *IGH* Assay es  $\geq 5$  días cuando se conserva a 2 °C - 8 °C o a temperatura ambiente (15 °C - 30 °C).

## 12.2. Valor de corte clínico

- 12.2.1. Este estudio realiza una evaluación comparativa de los datos históricos generados a partir del IdentiClone Dx *IGH* Assay con muestras clínicas, previamente identificadas como positivas para reordenamientos del gen *IGH* clonal, para establecer el valor de corte clínico de la relación de pico relativa (RPR). Los dos métodos de referencia seleccionados incluyen 1) un ensayo IVD comercialmente disponible (en el momento del estudio) que aplica secuenciación de nueva generación (NGS) para detectar reordenamientos del gen *IGH* clonal (ensayo de referencia), con un uso previsto similar al dispositivo en investigación, el IdentiClone Dx *IGH* Assay y 2) el diagnóstico clínico basado en los códigos ICD-10 para la enfermedad linfoproliferativa de células B (asignada clonal) o sana (asignada no clonal).
- 12.2.2. En total, se evaluaron los resultados de 170 especímenes. El primer conjunto de datos incluyó 114 muestras que generaron un resultado válido tanto con el ensayo de referencia (IVD) como con el IdentiClone Dx *IGH* Assay (IUO); estas muestras se evaluaron en cuanto a la concordancia porcentual (%) de los resultados generados por los dos ensayos. La evaluación se realizó utilizando 3 valores de RPR diferentes como valor de corte: 2,0, 3,0 y 4,0. El segundo conjunto de datos incluyó 145 muestras que generaron un resultado válido con el IdentiClone Dx *IGH* Assay junto con un diagnóstico clínico conocido basado en el código ICD-10 o en el estado sano. Este conjunto de datos se evaluó para comprobar la concordancia porcentual entre las 2 clasificaciones (clonal o no clonal) utilizando un valor de corte de 3,0. Se utilizaron diferentes subconjuntos de resultados de la prueba de los 170 especímenes para la evaluación porque algunos especímenes generaron resultados no válidos con el IdentiClone Dx *IGH* Assay (IUO) o el ensayo de referencia (IVD), o porque no se disponía de información de diagnóstico clínico (código ICD-10 o estado sano).
- 12.2.2.1. El primer conjunto de datos de 114 muestras comparó los resultados de clonalidad generados por el IdentiClone Dx *IGH* Assay con el ensayo de referencia utilizando el valor de RPR establecido en  $\geq 3,0$  como valor de corte. La CPG, CPP y CPN frente al ensayo de referencia fueron del 92,1 %, 93,8 % y 87,9 %, respectivamente. El límite inferior del IC del 95 % calculado utilizando el método de puntuación bilateral para CPP y CPN fue del 86,4 % y del 72,7 %, respectivamente. (Tabla 9) Para garantizar la solidez de un valor de RPR de corte clínico de 3,0, se volvieron a analizar los mismos datos utilizando valores de RPR tanto por debajo como por encima de una RPR = 3,0 (es decir, RPR = 2,0 y RPR = 4,0). Se demostró que el valor de corte clínico para RPR establecido en  $\geq 3,0$  era óptimo, ya que generaba el mejor valor de concordancia porcentual entre el dispositivo en investigación y el ensayo de referencia, con un espacio más amplio lejos del valor de RPR clasificado inmediatamente por debajo.

Tabla 9. Evaluación frente al ensayo de referencia (IVD)

IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay (IUO)	Ensayo de referencia (IVD)		Total
	Clonal	No clonal	
Clonal	76	4	<b>80</b>
No clonal	5	29	<b>34</b>
<b>Total</b>	<b>81</b>	<b>33</b>	<b>114</b>
CPG	92,1 %		
CPP	93,8 % (IC 95 %: 86,4 % - 97,3 %)		
CPN	87,9 % (IC 95 %: 72,7 % - 95,2 %)		

12.2.2.2. El segundo conjunto de datos constaba de 145 muestras y comparó un diagnóstico clínico conocido (código ICD-10 o estado sano) con los resultados de clonalidad generados con el IdentiClone Dx *IGH* Assay utilizando un valor de RPR  $\geq 3,0$  como valor de corte. La CPG, CPP y CPN resultantes frente al diagnóstico clínico fueron del 91,7 %, 92,8 % y 90,3 %, respectivamente. El IC del 95 % del LI calculado utilizando el método de puntuación bilateral para la CPP y CPN fue del 85,1 % y del 80,5 %, respectivamente. (Tabla 10)

**Tabla 10. Evaluación con diagnóstico clínico como método de referencia**

IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay (IUO)	Diagnóstico clínico (referencia)		Total
	Enfermedad linfoproliferativa de células B	Sano	
Clonal	77	6	83
No clonal	6	56	62
<b>Total</b>	<b>83</b>	<b>62</b>	<b>145</b>
CPG	91,7 %		
CPP	92,8 % (IC 95 %: 85,1 % - 96,6 %)		
CPN	90,3 % (IC 95 %: 80,5 % - 95,5 %)		

12.2.3. Los resultados de la prueba de muestras clínicas generados por el IdentiClone Dx *IGH* Assay demuestran una alta concordancia con los métodos de referencia, utilizando un valor de corte clínico de RPR establecido en  $\geq 3,0$ , que es también el valor de RPR discriminador para determinar la clonalidad. El LI del IC del 95 % para la CPP y CPN estuvieron ambos por encima del 70 % en comparación con el ensayo de referencia basado en NGS, un ensayo IVD comercialmente disponible o en comparación con el diagnóstico clínico.

### 12.3. Sensibilidad analítica: Límite de blanco (LB)

12.3.1. Este estudio establece el límite de blanco (LB) para el IdentiClone Dx *IGH* Assay analizando 20 especímenes de donantes no clonales (3 réplicas cada uno) con 2 lotes de reactivos en varios ABI 3500xL Dx Genetic Analyzers, por varios operadores durante varios días (60 puntos de datos por mezcla maestra, por lote de reactivos).

12.3.2. Todas (100 %) las muestras del panel de prueba de LB analizadas fueron no clonales (negativas) con una RPR  $< 3,0$ . El mayor RPR observado (2,9) se generó analizando un espécimen clínico negativo con MMA, lote de reactivos 2. Para cada lote de reactivos, se clasificaron 60 resultados de la prueba según la RPR. El percentil 95 responde al 57,5° rango; por lo tanto, se calculó el promedio de la RPR del 57° y del 58° rango para cada mezcla maestra para cada lote de reactivos. (Tabla 11) En conclusión, utilizando el enfoque conservador, se determinó que el LB global del ensayo era RPR de 2,0.

**Tabla 11. Resumen de resultados de LB**

Lote de reactivos	MM	Rango	RPR	RPR promedio de los rangos 57 + 58
1	A	57	1,7	1,8
		58	1,8	
	B	57	1,9	2,0
		58	2,0	
	C	57	1,7	1,7
		58	1,7	
2	A	57	1,8	1,9
		58	1,9	
	B	57	1,8	1,9
		58	1,9	
	C	57	1,8	1,9
		58	1,9	

## 12.4. Sensibilidad analítica: Límite de detección (LD)

- 12.4.1. Este estudio establece un límite de detección (LD) para el IdentiClone Dx *IGH* Assay proporcionando pruebas objetivas de los resultados generados con ADNg clínico extraído de sangre periférica que representa los clanes de *IGH* (I, II y III) diluidos con ADNg de sangre periférica combinada (SPC) obtenida de donantes sanos.
- 12.4.2. Un total de 20 especímenes (10 donantes sanos y 10 donantes con sospecha de linfoproliferación de células B con estado no clonal) conformaron la SPC utilizada para preparar las 7 diluciones de ADNg que representan cada clan de *IGH* (I/II/III) utilizado para el análisis con el dispositivo en investigación: 0,0 %, 0,3 %, 1,0 %, 3,0 % y 10,0 %. Los valores de RPR resultantes de las muestras que generaron un resultado clonal se verificaron con la tabla de patrones de clonalidad (Tabla 12), que proporciona la correlación entre el valor de RPR generado para cada mezcla maestra con cada clan de *IGH* con la dilución porcentual de la reordenación de *IGH* clonal. Se generaron un mínimo de 20 resultados válidos con el IdentiClone Dx *IGH* Assay para cada clan de *IGH* en cada dilución, con cada lote de reactivos. Este estudio fue realizado con 2 lotes de reactivos, en varios instrumentos ABI 3500xL Dx, por varios operadores durante varios días.

**Tabla 12. Tabla de patrones de clonalidad**

% de dilución o % de clonalidad	Valores de RPR de mezcla maestra								
	<i>IGH</i> clan I <sup>A</sup>			<i>IGH</i> clan II <sup>B</sup>		<i>IGH</i> clan III <sup>C</sup>			
	MMA	MMB	MMC	MMA	MMB	MMA	MMB	MMC	
25 %	65,2	121,9	131,5	91,2	119,5	149,7	169,1	162,8	
10 %	52,6	96,0	92,5	26,5	40,5	53,0	57,3	79,9	
5 %	30,4	48,0	50,4	12,1	18,1	28,7	31,8	34,2	
2,5 %	14,9	25,7	29,9	6,3	8,6	11,8	11,7	15,9	
1,0 %	5,1	10,8	13,3	2,3	3,0	3,9	4,8	7,1	
0,5 %	2,9	4,7	5,9	1,3	1,6	1,8	2,0	3,3	
0,25 %	1,4	2,3	3,1	1,3	1,3	1,4	1,3	1,8	
0,1 %	1,4	1,4	1,4	1,3	1,4	1,3	1,5	1,5	
0,05 %	1,3	1,4	1,3	1,5	1,3	1,2	1,2	1,4	

<sup>A</sup>Estirpe celular IVS-0019 utilizada como patrón clonal para la estimación de la clonalidad de *IGH* clan I

<sup>B</sup>Estirpe celular IVS-0002 utilizada como patrón clonal para la estimación de la clonalidad de *IGH* clan II

<sup>C</sup>Estirpe celular IVS-0003 utilizada como patrón clonal para la estimación de la clonalidad de *IGH* clan III

- 12.4.2.1. La dilución del 1,0 % del clan I de *IGH* amplificada con la mezcla maestra C (lote de reactivos 1 - 95 % positivo, RPR promedio = 4,1) y la dilución del clan I de *IGH* al 3,0 % con MMA, MMB y MMC (lote de reactivos 2 MMA - 100 % positivo, RPR promedio = 9,9; lote de reactivos 2 MMB - 100 % positivo, RPR promedio = 12,8; lote de reactivos 2 MMC - 100 % positivo, RPR promedio = 13,2) es la dilución del % más baja con un % positivo  $\geq 95$  % por lote de reactivos de mezcla maestra. (Tabla 13 y Tabla 14). Dado que el LD debe establecerse basándose en el peor rendimiento, se seleccionó para su evaluación el resultado de dilución porcentual más alto de los dos lotes de reactivos (valores de RPR generados por la dilución del 3,0 % de clan I de *IGH* con el lote de reactivos 2). Los valores de RPR generados por la dilución de clan I de *IGH* al 3,0 % con cada mezcla maestra se evaluaron frente a la tabla de patrones clonales para convertir el % de dilución en el % de clonalidad.
- 12.4.2.1.1. De acuerdo con la tabla de patrones clonales, los valores de RPR de MMA, MMB y MMC están dentro del intervalo correspondiente al intervalo de clonalidad del 1,0 % - 2,5 % para MMA (intervalo de RPR = 5,1 - 14,9), al intervalo de clonalidad del 1 % - 2,5 % para MMB (intervalo de RPR = 10,8 - 26,7) y al intervalo de clonalidad del 0,5 % - 1 % para MMC (intervalo de valor de RPR = 5,9 - 13,3). Utilizando un enfoque conservador, se determinó que el LD para el clan I de *IGH* era de clonalidad del 2,5 %.
- 12.4.2.2. La dilución del 3,0 % de clan 2 de *IGH* amplificada con MMB es la dilución porcentual más baja, donde se observó un % positivo de  $\geq 95$  % (lote de reactivos - 100 % positivo, RPR promedio = 8,5; lote de reactivos 2 - 100 % positivo, RPR promedio = 8,3). Los valores de RPR de 8,5 y 8,3 para MMB se correlacionan con una clonalidad del 1,0 % al 2,5 %, según la tabla de patrones clonales. Por lo tanto, se ha determinado que el LD para el clan 2 de *IGH* es de clonalidad del 2,5 %.
- 12.4.2.3. La dilución porcentual más baja, donde el porcentaje positivo de  $\geq 95$  % observado para clan III de *IGH* es la dilución del 1,0 % con MMC (100 % positivo, RPR promedio = 6,3) con ambos lotes de reactivos. Utilizando la tabla de patrones de clonalidad, una RPR de 6,3 está dentro de un intervalo de valores de RPR que corresponden a un intervalo de clonalidad del 0,5 % al 1,0 %. Por lo tanto, el LD para clan III de *IGH* se determina como clonalidad del 1,0 %.

12.4.3. Dado que se determinó que el LD para clan I, II y III de *IGH* era del 2,5 %, 2,5 % y 1 % de clonalidad, y aplicando un enfoque conservador, se determinó que el LD general del ensayo era del 2,5 %.

**Tabla 13. Resumen de resultados de LD para el lote de reactivos 1**

Clan	% de dilución	MMA			MMB			MMC		
		n válida	% pos	RPR promedio	n válida	% pos	RPR promedio	n válida	% pos	RPR promedio
N/A	0,0	19	0	1,4	20	0	1,4	20	0	1,4
I	0,1	20	0	1,4	20	0	1,4	20	0	1,4
	0,3	20	0	1,3	20	0	1,4	20	0	1,3
	1,0	18	50,0	3,0	19	89,5	3,8	20	95,0	4,1
	3,0	20	100,0	10,2	20	100,0	13,3	20	100,0	12,9
	10,0	19	100,0	40,3	20	100,0	52,7	20	100,0	45,9
	30,0	20	100,0	91,4	20	100,0	144,5	20	100,0	111,2
II	0,1	20	0	1,4	20	0	1,5	20	0	1,4
	0,3	20	0	1,3	20	0	1,6	20	0	1,4
	1,0	19	0	1,3	20	50,0	2,9	20	0	1,3
	3,0	19	0	1,9	20	100,0	8,5	20	0	1,4
	10,0	20	100,0	6,9	20	100,0	30,7	19	0	1,3
	30,0	20	100,0	28,8	20	100,0	99	20	0	1,3
III	0,1	20	0	1,4	20	0	1,4	20	0	1,3
	0,3	20	0	2,0	20	0	1,5	20	0	1,9
	1,0	20	100,0	5,8	20	95,0	4,4	19	100,0	6,3
	3,0	20	100,0	17,5	19	100,0	14	20	100,0	19,2
	10,0	20	100,0	59,3	20	100,0	52,8	20	100,0	67,6
	30,0	20	100,0	113,9	20	100,0	132,5	20	100,0	147,4

**Tabla 14. Resumen de resultados de LD para el lote de reactivos 2**

Clan <i>IGH</i>	% de dilución	MMA				MMB				MMC			
		n válida	n clonal	% pos	RPR promedio	n válida	n clonal	% pos	RPR promedio	n válida	n clonal	% pos	RPR promedio
N/A	0,0	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,4
I	0,1	20	0	0,0	1,3	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,3
	0,3	20	0	0,0	1,3	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,5
	1,0	20	10	50,0	3,0	19	16	84,2	3,8	19	17	89,5	3,9
	3,0	18	18	100,0	9,9	20	20	100,0	12,8	20	20	100,0	13,2
	10,0	20	20	100,0	37,4	20	20	100,0	53,7	19	19	100,0	46,3
	30,0	20	20	100,0	90,4	20	20	100,0	118,7	20	20	100,0	114,9
II	0,1	20	0	0,0	1,3	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,4
	0,3	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,6	20	0	0,0	1,4
	1,0	20	0	0,0	1,3	20	10	50,0	3,1	20	0	0,0	1,4
	3,0	20	0	0,0	1,7	20	20	100,0	8,3	20	0	0,0	1,4
	10,0	20	20	100,0	6,5	20	20	100,0	28,9	19	0	0,0	1,3
	30,0	20	20	100,0	28,3	20	20	100,0	82,8	20	0	0,0	1,4

Tabla 14. Resumen de resultados de LD para el lote de reactivos 2

Clan <i>IGH</i>	% de dilución	MMA				MMB				MMC			
		n válida	n clonal	% pos	RPR promedio	n válida	n clonal	% pos	RPR promedio	n válida	n clonal	% pos	RPR promedio
III	0,1	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,3	20	0	0,0	1,4
	0,3	20	0	0,0	2,1	20	0	0,0	1,7	20	0	0,0	2,1
	1,0	19	19	100,0	6,1	19	18	94,7	5,2	20	20	100,0	6,3
	3,0	20	20	100,0	18,7	20	20	100,0	14,6	20	20	100,0	18,9
	10,0	19	19	100,0	65,9	20	20	100,0	54,3	20	20	100,0	63,7
	30,0	20	20	100,0	133,9	20	20	100,0	125,7	20	20	100,0	131,5

## 12.5. Especificidad analítica: Sustancias interferentes

- 12.5.1. Este diseño del estudio se basó en los estándares CLSI EP07-A3 y EP37-Ed1 e incluye la evaluación del efecto de 6 sustancias diferentes potencialmente interferentes cuando están presentes en el espécimen analizado con el IdentiClone Dx *IGH* Assay. Las sustancias analizadas fueron bilirrubina, hemoglobina, colesterol, EDTA, triglicérido y etanol al 70 %, que se añadió a las muestras de ADNg después de la extracción, ya que la posible introducción de esta sustancia en el flujo de trabajo del ensayo tendría lugar después de la extracción de ADNg. De lo contrario, las demás sustancias se añadieron a especímenes de PB nuevos antes de la extracción de ADNg.
- 12.5.2. En este estudio se utilizó un total de 24 muestras de sangre periférica reciente (no congelada) anticoagulada en especímenes con EDTA de donantes normales (negativos/no clonales) o de donantes con linfoproliferación de células B diagnosticados (positivos/clonales) y se almacenaron a una temperatura de 2 °C a 8 °C hasta 7 días antes de la extracción del ADNg. Cada espécimen se analizó por duplicado, sin adición o con adición, lo que incluía 10 especímenes clonales por sustancia y 5 especímenes no clonales por sustancia. Este estudio fue realizado con 2 lotes de reactivos, en varios instrumentos ABI 3500xL Dx, por varios operadores durante varios días.
- 12.5.3. Los resultados de este estudio se presentan en la Tabla 15 y no muestran ninguna interferencia de las 6 sustancias a las concentraciones analizadas. Todas los especímenes generaron el estado de clonalidad esperado (clonal o no clonal) cuando se analizaron sin adición frente a con adición. Específicamente, cada sustancia interferente analizó 5 especímenes no clonales y 10 clonales, con excepción de la sustancia colesterol. El colesterol se analizó con 5 especímenes no clonales y 11 especímenes clonales, y cada muestra sin adición o con adición se analizó por duplicado. En total, se determinaron 30 resultados de clonalidad para cada sustancia interferente antes y después de la adición, excepto para el colesterol (32 resultados finales). Todos los resultados del estado de clonalidad generados por las muestras con adición coincidieron con los resultados del estado de clonalidad generados por las muestras sin adición correspondientes, lo que demuestra que las sustancias analizadas no impusieron interferencias en el ensayo a la concentración analizada. El límite inferior del intervalo de confianza del 95 % para el porcentaje de concordancia para cada sustancia interferente fue igual o superior al 88,4 %. (Tabla 15)

Tabla 15. Porcentaje de concordancia de llamada final sin adición frente a sustancia interferente

Sustancia interferente (concentración final de la prueba)	Tipo de muestra	N	Resultados totales de la prueba		Resultados concordantes totales <sup>2</sup>	% de concordancia (IC del 95 %) <sup>3</sup>
			Sin adición	Con adición		
Colesterol (4,0 mg/ml)	No clonal	5	32	32	32	100,0 %
	Clonal	11				(89,1-100,0)
Triglicérido (15,0 mg/ml)	No clonal	5	30	30	30	100,0 %
	Clonal	10				(88,4-100,0)
Hemoglobina 100 mg/ml)	No clonal	5	30	30	30	100,0 %
	Clonal	10				(88,4-100,0)
Bilirrubina (0,4 mg/ml)	No clonal	5	30	30	30	100,0 %
	Clonal	10				(88,4-100,0)
EDTA (5,4 mg/ml)	No clonal	5	30	30	30	100,0 %
	Clonal	10				(88,4-100,0)

Tabla 15. Porcentaje de concordancia de llamada final sin adición frente a sustancia interferente

Sustancia interferente (concentración final de la prueba)	Tipo de muestra	N	Resultados totales de la prueba		Resultados concordantes totales <sup>2</sup>	% de concordancia (IC del 95 %) <sup>3</sup>
			Sin adición	Con adición		
Etanol al 70 % (10 % v/v)	No clonal	5	30	30	30	100,0 %
	Clonal	10				(88,4-100,0)

<sup>1</sup>Dos réplicas por cada espécimen analizado antes y después de añadir sustancias interferentes.

<sup>2</sup>Resultados de la prueba con adición que coinciden con el resultado de la prueba sin adición correspondiente de los mismos especímenes.

<sup>3</sup>Método exacto de Pinper-Pearson.

## 12.6. Especificidad analítica: Contaminación cruzada / por arrastre

- 12.6.1. Este estudio evaluó la tasa de contaminación cruzada y por arrastre durante el flujo de trabajo del IdentiClone Dx IGH Assay en la configuración de la PCR y el análisis de fragmentos por electroforesis capilar. Se realizaron pruebas con 106 muestras negativas artificiales para contaminación por arrastre y 126 muestras negativas artificiales para contaminación cruzada. Se prepararon muestras negativas artificiales (no clonales) con ADN de control policlonal IVS-0000 al 100 %; muestras positivas artificiales (clonales) con ADN de control clonal IVS-0019 al 100 %.
- 12.6.2. El esquema de la placa consta de muestras positivas y negativas alternas en un patrón de tablero de ajedrez, diseñado para maximizar la aparición de contaminación por arrastre y contaminación cruzada. Estas muestras se amplificaron con la mezcla maestra A (MMA), elegida como mezcla maestra representativa, ya que la contaminación depende de la señal del amplicón, no de la mezcla maestra. El análisis se realizó en varias placas con diseños de muestras alternos en 2 ABI 3500xL Dx Genetic Analyzers diferentes, por un operador, con 1 lote de reactivos, durante varios días.
- 12.6.3. Antes de realizar la fragmentación por electroforesis capilar en las muestras de prueba, se estableció una referencia procesando una placa compuesta por una solución Liz/HIDI a través del instrumento para confirmar la ausencia de cualquier señal de contaminación presente en estudios anteriores. La contaminación por arrastre se evaluó utilizando datos generados por muestras negativas de placas que consistían en la misma disposición de muestras (10 inyecciones en total, 106 muestras negativas combinadas). Los 105 resultados negativos de las muestras que cumplieron los requisitos para la evaluación del arrastre generaron resultados no clonales, y el porcentaje de resultados falsos debidos al arrastre es del 0,0 % (0/105), con un IC inferior del 95 % del 96,5 %. La contaminación cruzada se evaluó utilizando datos generados a partir de muestras negativas de placas que contenían una disposición alternativa de las muestras (en comparación con las evaluadas para la contaminación por arrastre); 12 inyecciones en total, 126 muestras negativas combinadas; el porcentaje de resultados falsos debidos a la contaminación cruzada es del 0,0 % (0/125), con un IC inferior del 95 % del 97,1 %. De los 129 resultados positivos de las muestras, todos fueron clonal, excepto 2 resultados indeterminados, que generaron picos de altas UPR, en comparación con otras muestras positivas, y se determinó que eran señales válidas y potencialmente contaminantes. Los resultados positivos de las muestras en dos instrumentos generaron un valor de RPR promedio de 100,4, y el valor de RPR promedio de los resultados negativos de las muestras en dos instrumentos que reunieron los requisitos para la evaluación de la contaminación por arrastre y la contaminación cruzada fue de 1,2 y 1,2, respectivamente. (Tabla 16)

Tabla 16. Valores RPR promedio por instrumento ABI

Tipo	Instrumento ABI	N	RPR promedio	% CV
Clonal	1	65	97,8	30,2
	2	62	103,2	36,3
	Combinada	127	100,4	33,5
Arrastre (No clonal)	1	63	1,2	4,3
	2	62	1,2	5,0
	Combinada	125	1,2	4,6
Contaminación cruzada (No clonal)	1	53	1,2	4,3
	2	52	1,2	4,8
	Combinada	105	1,2	4,6

## 12.7. Especificidad analítica: Estudio de precisión intralaboratorio

- 12.7.1. La precisión del IdentiClone Dx *IGH* Assay fue determinada analizando el mismo grupo de muestras por 3 operadores, en 3 instrumentos con 3 lotes de reactivos, durante 20 días. El grupo de muestras consistió en 1 muestra negativa de ADN<sub>g</sub>, preparada a partir de una mezcla de especímenes clínicos negativos, y 6 muestras positivas, preparadas a partir de especímenes clínicos positivos de ADN<sub>g</sub> mezclados con ADN<sub>g</sub> de especímenes clínicos negativos combinados a 1,5X LD y 3X LD. Todas las muestras del panel se analizaron por triplicado y las pruebas se realizaron con una diferencia de al menos 20 días.
- 12.7.2. Todos los resultados de la prueba del panel coincidieron con el resultado de clonalidad esperado (100,0 %). La muestra negativa generó resultados no clonales en todas las réplicas (100,0 %). Las muestras positivas bajas (1,5X LD) generaron resultados clonales en todas las réplicas (100,0 %), y las muestras positivas altas también generaron resultados clonales en todas las réplicas (100,0 %). El % CV del valor de RPR producido por cada mezcla maestra se indica en la Tabla 17, y el % CV del valor de RPR generado por las muestras positivas bajas con las mezclas maestras clonales se muestra a continuación.
- 12.7.2.1. Valor de RPR para MMA, el % CV observado fue del 12,2 %
- 12.7.2.2. Valor de RPR para MMB, el % CV observado fue del 10,5 %
- 12.7.2.3. Valor de RPR para MMC, el % CV observado fue del 8,5 %
- 12.7.3. La variación total, entre el operador, los instrumentos, los lotes de reactivos y la variación intraanálisis se muestra en la Tabla 17.
- 12.7.3.1. Los resultados del factor de lote produjeron la mayor variabilidad intraanálisis para todas las muestras (variabilidad promedio = 7,9 %; mínimo = 0 % y máximo = 42,3 %).
- 12.7.3.2. Los resultados del factor de operador generaron un promedio del 3,1 % (mínimo = 0 % y máximo = 21,7 %).
- 12.7.3.3. El porcentaje de varianza atribuido al instrumento ABI tuvo una varianza media del 2,2 % (mínimo = 0 % y máximo = 8,5 %).
- 12.7.3.4. Los resultados del factor intrínseco atribuidos a una varianza media del 86,9 % (mínimo = 55,4 % y máximo = 99,9 %).
- 12.7.4. En general, todos los resultados de la prueba de la muestra coincidieron con el resultado de clonalidad esperado (100,0 %). El valor de RPR %CV fue ≤25 para las muestras positivas bajas con MMA, MMB y MMC, respectivamente, entre 3 operadores, 3 instrumentos y 3 lotes de reactivos.

**Tabla 17. Variabilidad de la precisión del ensayo (intralaboratorio)**

PM	MM	N válida	RPR promedio	Tipo de variación				Variación total	
				Entre operadores	Entre instrumentos	Entre lotes de reactivos	Intraanálisis	DE	% CV
PM1	A	52	1,59	0,08 (7,7 %)	0,07 (5,9 %)	0,05 (3,3 %)	0,26 (83,2 %)	0,28	17,7
	B	53	1,67	0,00 (0,0 %)	0,05 (3,3 %)	0,06 (3,7 %)	0,28 (93,0 %)	0,29	17,2
	C	54	1,52	0,06 (7,1 %)	0,04 (3,4 %)	0,06 (5,2 %)	0,22 (84,3 %)	0,24	16,0
PM2	A	54	16,49	0,72 (12,8 %)	0,00 (0,0 %)	1,02 (25,7 %)	1,58 (61,5 %)	2,02	12,2
	B	54	22,09	0,00 (0,0 %)	0,05 (0,1 %)	0,00 (0,0 %)	2,16 (99,9 %)	2,16	9,8
	C	54	1,40	0,00 (0,0 %)	0,05 (8,5 %)	0,00 (0,0 %)	0,17 (91,5 %)	0,17	12,4
PM3	A	54	1,32	0,02 (1,3 %)	0,01 (0,5 %)	0,00 (0,0 %)	0,18 (98,2 %)	0,18	13,4
	B	53	23,57	0,20 (0,7 %)	0,60 (5,9 %)	1,53 (38,0 %)	1,84 (55,4 %)	2,47	10,5
	C	53	1,38	0,04 (5,6 %)	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,16 (94,4 %)	0,17	12,1
PM4	A	53	25,94	0,56 (1,4 %)	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	4,72 (98,6 %)	4,76	18,3
	B	54	42,10	0,14 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	2,41 (13,8 %)	6,04 (86,2 %)	6,50	15,4
	C	52	37,59	0,00 (0,0 %)	0,41 (1,6 %)	0,00 (0,0 %)	3,17 (98,4 %)	3,20	8,5
PM5	A	54	33,44	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	2,05 (12,4 %)	5,46 (87,6 %)	5,83	17,4
	B	54	49,18	0,00 (0,0 %)	0,78 (2,3 %)	0,00 (0,0 %)	5,03 (97,7 %)	5,09	10,4
	C	54	1,39	0,00 (0,0 %)	0,03 (2,2 %)	0,00 (0,0 %)	0,18 (97,8 %)	0,18	13,1
PM6	A	52	1,34	0,01 (1,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,14 (99,0 %)	0,14	10,6
	B	54	10,82	0,27 (6,3 %)	0,00 (0,0 %)	0,40 (14,4 %)	0,95 (79,3 %)	1,06	9,8
	C	54	1,37	0,00 (0,0 %)	0,04 (5,1 %)	0,00 (0,0 %)	0,16 (94,9 %)	0,17	12,1
PM7	A	54	54,44	0,00 (0,0 %)	1,97 (3,6 %)	0,00 (0,0 %)	10,13 (96,4 %)	10,32	19,0
	B	54	93,12	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	10,30 (42,3 %)	12,02 (57,7 %)	15,83	17,0
	C	53	77,58	4,16 (21,7 %)	1,52 (2,9 %)	2,12 (5,7 %)	7,46 (69,7 %)	8,93	11,5

## 12.8. Precisión de la medición: Estudio de reproducibilidad multicéntrico

- 12.8.1. El propósito de este estudio fue determinar si el IdentiClone Dx *IGH* Assay funciona según lo previsto cuando se analiza en 3 centros distintos. Las pruebas se realizaron en un panel que contenía 6 muestras positivas (3 positivas bajas y 3 positivas medias) y una muestra negativa con el dispositivo en investigación por triplicado, utilizando 1 lote de reactivos por 2 operadores en 3 centros de análisis diferentes sobre 5 casos de análisis diferentes. El miembro negativo del panel se preparó a partir de una mezcla de especímenes clínicos de ADN<sub>g</sub> previamente determinadas como no clonales para *IGH*, y las muestras positivas del panel consistían en ADN<sub>g</sub> de especímenes clínicos (previamente determinado como clonal para *IGH*) mezclado con ADN<sub>g</sub> de especímenes clínicos combinados negativos a 1,5X LD (positivo bajo) y 3X LD (positivo medio).
- 12.8.2. El miembro negativo del panel generó resultados no clonales en los tres centros en todos los casos válidos (100,0 %, 88/88). Los miembros del panel positivo bajo y medio generaron resultados clonales en los tres centros en todos los casos válidos (100,0 %, 90/90 y 100,0 %, 90/90, respectivamente). La variación total de los valores de RPR debidos al centro, al operador, a la instancia, intraanálisis y al % CV del valor de RPR para cada miembro del grupo de muestras se muestra en la Tabla 18 (mezcla maestra dominante con mayor RPR solo para PM positivos; las tres mezclas maestras para PM negativos).
- 12.8.3. En general, el cociente de varianza atribuido al centro tuvo un promedio del 15,4 % y un intervalo del 0,0 % al 50,9 %.
- 12.8.3.1. El cociente de varianza atribuido al operador tuvo un promedio del 0,5 % y un intervalo del 0,0 % al 4,3 %.
- 12.8.3.2. El cociente de varianza atribuido a la instancia de prueba tuvo un promedio del 9,9 % y un intervalo del 0,0 % al 20,8 %.
- 12.8.3.3. El cociente de varianza atribuido a la intraanálisis tuvo un promedio del 75,5 % y un intervalo del 31,7 % al 100,0 %, respectivamente.

**Tabla 18. Variabilidad de precisión entre centros del IdentiClone Dx *IGH* Assay por valor de RPR**

Tipo de control	MM	N	Estadísticas resumidas			Tipo de variación				Variación total	
			Mín	Media	Máx	Entre centros	Entre operadores	Entre instancias <sup>1</sup>	Intraanálisis	DE	% CV
Positivo bajo	A	88	7,00	22,91	29,70	0,00 (0,0 %)	0,04 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	3,44 (100 %)	3,44	15,0
	B	90	15,10	20,16	27,00	0,78 (10,0 %)	0,00 (0,0 %)	1,09 (19,6 %)	2,07 (70,4 %)	2,47	12,2
	C	90	31,10	54,81	72,10	2,40 (10,0 %)	0,43 (0,3 %)	3,07 (16,4 %)	6,50 (73,3 %)	7,59	13,8
Positivo medio	A	90	30,00	48,81	75,60	4,71 (35,1 %)	0,00 (0,0 %)	2,13 (7,2 %)	6,04 (57,7 %)	7,95	16,3
	B	90	26,00	38,83	59,10	2,77 (20,3 %)	0,00 (0,0 %)	2,80 (20,8 %)	4,72 (58,9 %)	6,15	15,8
	C	89	34,30	98,63	141,4	17,36 (50,9 %)	5,06 (4,3 %)	8,80 (13,1 %)	13,69 (31,7 %)	24,32	24,7
Negativo	A	88	1,10	1,46	2,00	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,07 (12,3 %)	0,20 (87,7 %)	0,21	14,4
	B	90	1,10	1,43	2,30	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,21 (100 %)	0,21	15,0
	C	90	1,10	1,43	1,90	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,18 (100 %)	0,18	12,5

<sup>1</sup>Instancias de análisis; para cada centro, hubo 5.

## 12.9. Validación del flujo de trabajo del ensayo: Estudio de extracción de ADN

- 12.9.1. Este estudio proporciona pruebas objetivas de que tres métodos de extracción de ADN genómico (ADN<sub>g</sub>) comunes y comercialmente disponibles generan una cantidad suficiente de ADN<sub>g</sub> para el IdentiClone Dx *IGH* Assay. Se evaluaron tres (3) métodos de extracción diferentes disponibles comercialmente: 1) aislamiento de columnas de sílice, 2) extracción automatizada basada en microesferas magnéticas (utilizando King Fisher Flex) y 3) precipitación para extraer ADN<sub>g</sub> de especímenes de sangre periférica recogidos en EDTA de 2 donantes únicos con diagnóstico linfoproliferativo de células B (clonal) y 8 donantes sanos únicos (no clonales). La Tabla 19 enumera los kits por proveedor y método de extracción.

**Tabla 19: Kits de extracción por método de extracción**

Método	Nombre del kit	Proveedor	Método de extracción
1	Kit QIAamp DNA Blood Mini (QIA)	QIAGEN	Membrana de sílice
2	Kit de purificación de ADN genómico Promega Wizard® (PWIZ)	Promega	Precipitación
3	Kit MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 (KFF)	Thermo Fisher Scientific	Microesfera magnética

- 12.9.2. Las muestras se extrajeron siguiendo las instrucciones asociadas del fabricante, y el ADN<sub>g</sub> resultante se cuantificó utilizando un espectrofotómetro UV-VIS y NanoDrop 2000. Tras la cuantificación, el ADN<sub>g</sub> (1 réplica por método de extracción) se analizó con el IdentiClone Dx *IGH* Assay; la finalización del análisis de datos tuvo lugar en las 48 horas siguientes a la extracción.
- 12.9.3. Se demostró que los tres métodos de extracción generaban la cantidad necesaria de ADN<sub>g</sub> en el ensayo, en la que cada muestra generaba  $\geq 250$  ng de ADN<sub>g</sub> independientemente del método de extracción. La cantidad total de ADN<sub>g</sub> se calculó a partir del promedio de 3 réplicas de lecturas de Nanodrop para cada uno de los 10 especímenes, para cada método de extracción. (Tabla 20) Se utilizaron diferentes volúmenes para cumplir los requisitos de cada kit de extracción:
- 12.9.3.1. El kit PWIZ requirió 300  $\mu$ l de sangre periférica y el ADN<sub>g</sub> se eluyó en 100  $\mu$ l, lo que generó un intervalo de 6846,7 ng-26 336,7 ng de ADN<sub>g</sub> total
  - 12.9.3.2. El kit QIA requirió 200  $\mu$ l de sangre periférica y el ADN<sub>g</sub> se eluyó en 50  $\mu$ l, generando un intervalo de 2656,7 ng a 10 963,3 ng de ADN<sub>g</sub> total
  - 12.9.3.3. El kit KFF requirió 300  $\mu$ l de sangre periférica y el ADN<sub>g</sub> se eluyó en 50  $\mu$ l, generando un intervalo de 6795,0 ng a 33 338,3 ng de ADN<sub>g</sub> total

**Tabla 20: Resumen de ADN<sub>g</sub> extraído total**

N.º de espécimen	QIA ADN <sub>g</sub> total (ng)	Concentración media de ADN <sub>g</sub> de QIA (ng/ $\mu$ l)	PWIZ ADN <sub>g</sub> total (ng)	ADN <sub>g</sub> promedio de PWIZ Concentración (ng/ $\mu$ l)	KFF ADN <sub>g</sub> total (ng)	ADN <sub>g</sub> promedio de KFF Concentración (ng/ $\mu$ l)
1	7230,0	144,6	19163,3	191,6	22101,7	442,0
2	3651,7	73,0	7593,3	75,9	10471,7	209,4
3	2656,7	53,1	6846,7	68,5	8313,3	166,3
4	4238,3	84,8	9586,7	95,9	9535,0	190,7
5	4908,3	98,2	13496,7	135,0	14426,7	288,5
6	5496,7	109,9	13506,7	135,1	16171,7	323,4
7	3981,7	79,6	11896,7	119,0	14963,3	299,3
8	4403,3	88,1	11990,0	119,9	6975,0	139,5
9	8776,7	175,5	17043,3	170,4	20606,7	412,1
10	10963,3	219,3	26336,7	263,4	33338,3	666,8

- 12.9.4. Las 30 réplicas (10 especímenes analizados con 3 métodos de extracción) generaron al menos 250 ng de ADN<sub>g</sub> (30/30, con límite inferior del intervalo de confianza del 95 %  $\geq 80$  %). El ADN<sub>g</sub> total recuperado de los métodos PWIZ y KFF fue similar porque se utilizó el mismo volumen de entrada de sangre periférica (300  $\mu$ l) por extracción, en comparación con QIA, que utilizó un volumen de entrada de sangre periférica inferior (200  $\mu$ l). Cuando se analizó con el IdentiClone Dx *IGH* Assay, el ADN<sub>g</sub> extraído mostró valores de RPR similares (% CV entre 1 % y 21 %) y resultados de la mezcla maestra concordantes en los tres métodos de extracción. (Tabla 21) El procesamiento de muestras (incluida la extracción de ADN) hasta la obtención de resultados (incluido el análisis de datos) tardó 28 horas o menos para todas las muestras.

**Tabla 21: Resumen de los resultados del IdentiClone Dx *IGH* Assay de los 3 métodos de extracción**

Muestra	MM o Global	RPR QIA	RPR PWIZ	RPR KFF	% CV
PM1	A	1,5	1,5	1,3	7 %
	B	1,6	1,8	1,2	16 %
	C	1,4	1,3	1,4	3 %
	Global	No clonal	No clonal	No clonal	N/A
PM2	A	Error CT*	1,4	1,3	4 %
	B	1,3	1,3	1,5	7 %
	C	1,8	1,1	1,4	20 %
	Global	N/A	No clonal	No clonal	N/A
PM3	A	1,3	1,6	1,5	9 %
	B	1,5	1,1	1,6	15 %
	C	1,8	1,2	1,2	20 %
	Global	No clonal	No clonal	No clonal	N/A

Tabla 21: Resumen de los resultados del IdentiClone Dx *IGH* Assay de los 3 métodos de extracción

Muestra	MM o Global	RPR QIA	RPR PWIZ	RPR KFF	% CV
PM4	A	No válido	1,2	1,4	8 %
	B	1,8	1,4	1,4	12 %
	C	1,2	1,4	1,3	6 %
	Global	N/A	No clonal	No clonal	N/A
PM5	A	1,5	1,4	1,2	9 %
	B	1,4	1,1	1,5	13 %
	C	1,2	1,2	1,1	4 %
	Global	No clonal	No clonal	No clonal	N/A
PM6	A	1,6	1,2	1,2	14 %
	B	1,2	1,5	No válido	11 %
	C	1,4	1,6	1,6	6 %
	Global	No clonal	No clonal	N/A	N/A
PM7	A	1,2	1,3	1,6	12 %
	B	1,5	1,7	1,3	11 %
	C	1,7	1,4	1,2	14 %
	Global	No clonal	No clonal	No clonal	N/A
PM8	A	1,3	1,2	No válido	4 %
	B	1,5	1,7	1,5	6 %
	C	1,3	1,3	1,6	10 %
	Global	No clonal	No clonal	N/A	N/A
PM9	A	1,7	1,3	1,6	11 %
	B	66,3	112,8	86,9	21 %
	C	76,5	65,9	71,5	6 %
	Global	Clonal	Clonal	Clonal	N/A
PM10	A	145,9	185,7	165,9	10 %
	B	196,7	192,6	196,9	1 %
	C	233,2	199,1	216,5	6 %
	Global	Clonal	Clonal	Clonal	N/A

\*No se volvió a analizar.

N/A = No aplicable

## 12.10. Validación del flujo de trabajo del ensayo: Estudio de entrada de ADN

- 12.10.1. El propósito de este estudio es proporcionar pruebas objetivas de los requisitos de entrada de ADNg para el IdentiClone Dx *IGH* Assay. Se realizó una evaluación de 5 cantidades diferentes de entrada de ADNg (500 ng, 250 ng, 200 ng, 125 ng y 25 ng) en 10 muestras clínicas (5 con diagnóstico clínico positivo y 5 con diagnóstico clínico negativo de linfoproliferación de células B) utilizando el IdentiClone Dx *IGH* Assay. La concentración de todas las muestras de ADNg se midió utilizando el mismo espectrofotómetro Nanodrop 2000. Las pruebas se realizaron por duplicado en 6 ciclos, en 1 instrumento ABI 3500xL Dx por un operador, utilizando 1 lote de reactivos, durante varios días.
- 12.10.2. De los 100 resultados posibles de estado de clonalidad (10 especímenes analizados por duplicado para 5 condiciones de entrada diferentes), 96 resultados totales (utilizando las 3 mezclas maestras). Las 4 muestras que no generaron resultados globales contenían el nivel de entrada de ADN más bajo (25 ng), en el que las réplicas tuvieron resultados no válidos debido a una amplificación baja en una o más mezclas maestras. La causa probable de estos resultados no válidos es una entrada de ADN insuficiente, por lo que estos resultados no válidos no se volvieron a analizar. De los 96 resultados globales generados, 95 coincidieron con los resultados esperados; la concordancia global es del 99,0 %; la tabla 22 proporciona la concordancia de resultados del estado de clonalidad por miembro del panel y nivel de entrada de ADN. El único resultado discordante se produjo en PM09, que contenía el nivel de entrada de ADN más bajo (25 ng); una réplica de este miembro del panel no clonal esperado generó un resultado «Clonal» con la mezcla maestra B, generando un valor de RPR de 3,2, que está por encima del valor de corte del ensayo de 3,0. Este resultado discordante se

debió potencialmente a la baja entrada de ADN, que puede haber reducido la URF del pico de fondo (denominador para el cálculo de la RPR) más que las URF del pico más alto (numerador para el cálculo de la RPR), lo que infla artificialmente la RPR para que esté ligeramente por encima de la RPR de corte de 3,0. De los 20 resultados de estado de clonalidad generados con la entrada de ADN prevista (250 ng), todos coincidieron con los resultados esperados. La concordancia global de resultados para el nivel de entrada de ADN previsto es del 100,0 %.

**Tabla 22: Concordancia global de resultados**

Miembro del panel	Clonalidad esperada	Concordancia global de resultados				
		500 ng	250 ng (Indicado)	200 ng	125 ng	25 ng
PM01	Clonal	100 % (2/2)	<b>100 % (2/2)</b>	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM02	Clonal	100 % (2/2)	<b>100 % (2/2)</b>	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM03	Clonal	100 % (2/2)	<b>100 % (2/2)</b>	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM04	Clonal	100 % (2/2)	<b>100 % (2/2)</b>	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM05	Clonal	100 % (2/2)	<b>100 % (2/2)</b>	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM06	No clonal	100 % (2/2)	<b>100 % (2/2)</b>	100 % (2/2)	100 % (2/2)	N/A
PM07	No clonal	100 % (2/2)	<b>100 % (2/2)</b>	100 % (2/2)	100 % (2/2)	N/A
PM08	No clonal	100 % (2/2)	<b>100 % (2/2)</b>	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM09	No clonal	100 % (2/2)	<b>100 % (2/2)</b>	100 % (2/2)	100 % (2/2)	50 % (1/2)
PM10	No clonal	100 % (2/2)	<b>100 % (2/2)</b>	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
<b>Global</b>		<b>100 % (20/20)</b>	<b>100 % (20/20)</b>	<b>100 % (20/20)</b>	<b>100 % (20/20)</b>	<b>93,8 % (15/16)</b>

### 12.11. Validación del flujo de trabajo del ensayo: Equivalencia: 3500xL frente a 3500xL Dx

- 12.11.1. Este estudio demuestra que los resultados del IdentiClone Dx *IGH* Assay son equivalentes cuando se obtienen utilizando dos versiones diferentes de un instrumento similar:
  - 12.11.1.1. El Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer (RUO) y
  - 12.11.1.2. El Applied Biosystems 3500xL Dx Genetic Analyzer (CE-IVD)
- 12.11.2. Muestras compuestas por 15 amplicones de 10 muestras clonales y 5 muestras no clonales (además de los amplicones de los controles de desarrollo asociados) y analizadas con IdentiClone Dx *IGH* Assay en 5 instrumentos ABI 3500 diferentes (2 RUO y 3 CE-IVD) cada una.
- 12.11.3. Los 5 instrumentos diferentes generaron un total de 75 resultados válidos (15 amplicones x 1 réplica x 5 instrumentos). Estos resultados se evaluaron adicionalmente para calcular los valores de la relación pico relativa (RPR), los resultados del estado de clonalidad, la RPR promedio por tipo de instrumento y la diferencia de RPR promedio entre los tipos de instrumento. (Figura 12)
- 12.11.4. Los resultados de la prueba generados con los 15 amplicones (10 clonales/positivos y 5 no clonales/negativos) coincidieron al 100 % con los resultados esperados en los 5 instrumentos. Los valores de RPR generados por los amplicones positivos oscilaron entre 17,0 y 97,0, y los valores de RPR generados por los amplicones negativos oscilaron entre 1,2 y 1,6. Se calculó una diferencia máxima del 61,9 % a partir de los valores de RPR promedio generados por los diferentes instrumentos; sin embargo, esto puede atribuirse a un resultado de la prueba RUO «atípico», que generó un valor de RPR significativamente menor, en comparación con los resultados de los otros cuatro instrumentos (40,1, en comparación con 70,4, 78,0, 93,3, 97,0 y 78,0, respectivamente). Dado que este amplicón es un positivo alto (alto porcentaje de clonalidad), es poco probable que cause una diferencia en el resultado del estado clonal cuando se analiza en un tipo de instrumento frente al otro. La diferencia porcentual más alta observada para los amplicones positivos y negativos restantes fue del 18,1 % y del 4,2 %, respectivamente. En general, los resultados de concordancia del 100,0 % producidos por los 5 instrumentos diferentes demuestran que el rendimiento del IdentiClone Dx *IGH* Assay en ABI 3500xL Dx y ABI 3500xL Genetic Analyzers son equivalentes.



12.12.5. Análisis de la seguridad

12.12.5.1. No se espera que el IdentiClone Dx IGH Assay suponga un riesgo directo para la seguridad de los sujetos y no se tomaron decisiones de tratamiento basadas en los resultados del IdentiClone Dx IGH Assay.

12.12.6. Efectividad

12.12.6.1. Validación clínica primaria del IdentiClone Dx IGH Assay

12.12.6.1.1. La intención principal de este estudio clínico establece la concordancia entre el dispositivo en investigación (IdentiClone Dx IGH Assay) y un ensayo de referencia (un ensayo IVD comercialmente disponible [en el momento del estudio] que aplica NGS para detectar reordenamientos clonales del gen IGH, con un uso previsto similar al dispositivo en investigación).

12.12.6.1.2. La concordancia entre los resultados de clonalidad del dispositivo en investigación (IdentiClone Dx IGH Assay) y del ensayo de referencia se muestra en la Tabla 23. De las 249 muestras evaluables mediante el método de referencia, 243 notificaron el mismo resultado con ambos métodos.

**Tabla 23: Concordancia entre el IdentiClone Dx IGH Assay (IUO) y el ensayo de referencia (IVD), incluidos los sujetos sanos**

IdentiClone Dx IGH Assay (IUO)	Ensayo de referencia (IVD)		
	+	-	Total
+	129	1	<b>130</b>
-	5	114	<b>119</b>
Total	<b>134</b>	<b>115</b>	<b>249</b>

12.12.6.1.3. Tabla 24 detalla la concordancia basada en la concordancia entre los resultados de clonalidad del IdentiClone Dx IGH Assay (IUO) y el ensayo de referencia basado en NGS (IVD). De las 249 muestras evaluables analizadas, 114 de las 115 muestras negativas (-) coincidieron entre ambos métodos, 129 de las 134 muestras positivas (+) coincidieron, para un CPN del 99,1 % y un CPP del 96,3 %. El límite inferior del intervalo de confianza (IC) del 95 % para el CPN es del 95,3 %, mientras que el límite inferior del IC del 95 % para el CPP es del 91,5 %; la Tabla 24 detalla la concordancia entre el dispositivo en investigación y el método de referencia. Los cocientes de probabilidad positivo y negativo se presentan en la Tabla 25.

**Tabla 24: Concordancia entre el dispositivo en investigación y el ensayo de referencia**

Medida de la concordancia	Porcentaje de concordancia (n/N)	IC del 95 % <sup>1</sup>
CPN	99,1 % (114 / 115)	(95,3 %, 100,0 %)
CPP	96,3 % (129/134)	(91,5 %, 98,8 %)

<sup>1</sup>El IC del 95 % se calcula utilizando el método exacto de Clopper-Pearson

**Tabla 25: Razón de verosimilitud entre el IdentiClone Dx IGH Assay y el ensayo de referencia (IVD), incluidos los sujetos sanos**

Razón de verosimilitud positiva	Razón de verosimilitud negativa
110,709	0,038

12.12.6.1.4. Tabla 26 presenta la concordancia entre los resultados de clonalidad del dispositivo en investigación y del ensayo de referencia *sin* sujetos sanos. De las 203 muestras evaluables mediante el método de referencia, 197 notificaron el mismo resultado con ambos métodos.

**Tabla 26: Concordancia entre el IdentiClone Dx IGH Assay (IUO) y el ensayo de referencia (IVD), excluidos los sujetos sanos**

IdentiClone Dx IGH Assay (IUO)	Ensayo de referencia (IVD) basado en NGS		
	+	-	Total
+	128	1	<b>129</b>
-	5	69	<b>74</b>
Total	<b>133</b>	<b>70</b>	<b>203</b>

- 12.12.6.1.1. La concordancia se basa en el acuerdo entre el dispositivo en investigación y el ensayo de referencia, *excluidos* los sujetos sanos (Tabla 27). De las 203 muestras evaluables analizadas, 69 de las 70 muestras negativas (-) coincidieron entre ambos métodos, 128 de las 134 muestras positivas (+) coincidieron, con un PCN del 98,6 % y un PCP del 96,2 %. El límite inferior del IC del 95 % para el CPN es del 92,3 %, mientras que el límite inferior del IC del 95 % para el CPP es del 91,4 %. Los cocientes de probabilidad positivo y negativo se presentan en la Tabla 28.

**Tabla 27: Concordancia entre el IdentiClone Dx IGH Assay (IUO) y el ensayo de referencia (IVD), *excluidos* los sujetos sanos**

Medida de la concordancia	Porcentaje de concordancia (n/N)	IC del 95 % <sup>1</sup>
CPN	98,6 % (69/70)	(92,3 %, 100,0 %)
CPP	96,2 % (128/ 133)	(91,4 %, 98,8 %)

<sup>1</sup>El IC del 95 % se calcula utilizando el método exacto de Clopper-Pearson

**Tabla 28: Razón de verosimilitud entre el IdentiClone Dx IGH Assay y el ensayo de referencia (IVD), *excluidos* los sujetos sanos**

Razón de verosimilitud positiva	Razón de verosimilitud negativa
67,368	0,038

12.12.7. Conclusiones

- 12.12.7.1. Esta evaluación clínica del IdentiClone Dx IGH Assay confirma que el dispositivo en investigación detecta con precisión los acontecimientos clonales en el gen de la cadena pesada de inmunoglobulina (IGH).
- 12.12.7.2. Este estudio fundamental de exactitud proporciona pruebas documentadas de que el dispositivo en investigación y el método de referencia (dispositivo confirmatorio) tienen tasas de detección similares para los acontecimientos clonales de IGH. Los objetivos principales de concordancia se establecieron en el 70 % de un límite inferior de un IC del 95 % tanto para el CPN como para el CPP, ya que estas dos tecnologías son bastante diferentes. Sin embargo, los resultados del ensayo demuestran que estas dos tecnologías identifican acontecimientos clonales a una tasa muy similar.
- 12.12.7.3. Se analizó mediante ambos métodos ADN desidentificado residual extraído de muestras de sangre periférica (SP) de personas con sospecha de trastornos linfoproliferativos de las células B. Un subconjunto de 249 muestras generaron resultados evaluables con ambos ensayos, y se cumplió el criterio de aceptación del estudio:
  - 12.12.7.3.1. El límite inferior del IC exacto del 95 % del CPN tenía que ser mayor o igual al 70 %. El límite inferior obtenido fue del 95 %.
    - 12.12.7.3.1.1. Se calculó que la especificidad diagnóstica era de 0,991.
    - 12.12.7.3.1.2. Razón de verosimilitud negativa: 0,038
  - 12.12.7.3.2. El límite inferior del IC exacto del 95 % del CPP fue mayor o igual al 70 %. El límite inferior obtenido fue del 92 %.
    - 12.12.7.3.2.1. Sensibilidad diagnóstica calculada en 0,963.
    - 12.12.7.3.2.2. Razón de verosimilitud positiva: 110,709
- 12.12.7.4. Hubo un resultado falso positivo y cinco resultados falsos negativos con el método en investigación.
- 12.12.7.5. Esta evaluación clínica del IdentiClone Dx IGH Assay confirma que el dispositivo en investigación detecta con precisión los acontecimientos clonales en el gen IGH.
- 12.12.7.6. No se identificaron problemas de seguridad durante la ejecución de este estudio.

## 13. Bibliografía

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. “Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2024; 74:229–263.
2. Siegel RL, Miller KD, and Jemal A. “Cancer Statistics, 2020.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2020; 70:7-30.
3. Cowan AJ, Allen C, Barac A, et al. “Global Burden of Multiple Myeloma: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016.” *Journal of American Medicine*, 2018 Sep; 4(9):1221-1227.
4. Miller JE, et al. “An automated semiquantitative B- and T-cell clonality assay.” *Molecular Diagnostics*, 1999; 4(2):101-117.
5. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, 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*, 2004 Jan; 17(12):2257–2317.
6. Van Krieken JHJM, Langerak AW, Macintyre EA, et al. “Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936.” *Leukemia*, 2007 Feb; 21(2):201-206.
7. Evans PAS, Pott Ch, Groenen PJTA, et al. “Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936.” *Leukemia*, 2007 Mar; 21(2):207-214.
8. Hongxiang L, Bench AJ, Bacon CM, et al. “A practical strategy for the routine use of BIOMED-2 PCR assays for detection of B- and T-cell clonality in diagnostic haematopathology.” *British Journal of Haematology*, 2007 Jul; 138(1):31-43.
9. Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggemann M, et al. (2012) “EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations.” *Leukemia*, 2012 Aug; 26(10):2159-2171.
10. Berget E, Helgeland L, Molven A, and Ventermyr, OK. “Detection of clonality in follicular lymphoma using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples and BIOMED-2 immunoglobulin primers.” *Journal of Clinical Pathology*, 2011; 64:37-41.
11. Hongxin F and Robetorye RS. “Detection of clonal immunoglobulin heavy chain gene rearrangements by the polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis.” *Methods in Molecular Biology*, 2013; 999:151-167.
12. Kokovic I, Novakovic BJ, Cerkovnik P, and Navakovic S. “Clonality analysis of lymphoid proliferations using the BIOMED-2 clonality assays: a single institution experience.” *Radiology and Oncology*, 2014 Jun; 48(2):155-162.
13. Roepman P, Boots C-M, Scheidel KC, et al. “Molecular clonality assessment shows high performance to predict malignant B-cell non-Hodgkin’s lymphoma using cytological smears.” *Journal of Clinical Pathology*, Published Online First: [12 May 2016] doi:10.1136/jclinpath-2016-203757
14. Zhang J-J, Xie Y-X, Luo L-L, et al. “A comparison of capillary electrophoresis and next-generation sequencing in the detection of immunoglobulin heavy chain H and light chain  $\kappa$  gene rearrangements in the diagnosis of classic hodgkin’s lymphoma.” *Bioengineered*, 2022; 13:3, 5868-5879.
15. Kirkham PM, Martari F, Newton JA and Schroeder HW. “Immunoglobulin VH clan and family identity predicts variable domain structure and may influence antigen binding.” *The EMBO Journal*, 1992; 11(2):603-609.
16. IdentiClone Dx IGH Software Instructions for Use – English (Invivoscribe : 310000)
17. ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer User Manual (Thermo Fisher: 100079380 Revision D)
18. ABI 3500xL Genetic Analyzer User Manual (Thermo Fisher: 4401661 Revision C)

## 14. Servicio técnico y atención al cliente

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

### Invivoscribe, Inc

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego, CA | 92121-2711 | EE. UU. Sitio web:










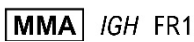

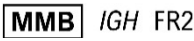

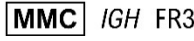







www.invivoscribe.com | Horario de oficina: De 07:00 a 17:00 PST/PDT

Teléfono: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601

Servicio técnico: support@invivoscribe.com | Servicio de atención al cliente: sales@invivoscribe.com

## 15. Símbolos

Los siguientes símbolos figuran en el etiquetado de este producto.

	Número de catálogo		ADN polimerasa Taq
	Volumen de reactivo		Control positivo de IGH
	Número de lote		Control negativo
	Condiciones de conservación		Control en blanco (CB)
	Identificador único del dispositivo		MMA IGH FR1 (mezcla maestra A)
	Fecha de caducidad		MMB IGH FR2 (mezcla maestra B)
	Proteger de la luz		MMC IGH FR3 (mezcla maestra C)
	Fabricante		Consulte las instrucciones de uso
	Conformidad europea		Representante Autorizado en Suiza
	Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>		Representante autorizado en la Comunidad Europea
			Persona Responsable del Reino Unido

## 16. Aviso legal

Para avisos legales relacionados con este producto, visite: <https://invivoscribe.com/legal-notices/>

## 17. Historial de revisiones

Tabla 29: Historial de revisiones de las instrucciones de uso del IdentiClone Dx IGH Assay y validación del organismo notificado

Revisión de las instrucciones de uso	Fecha de publicación	Descripción del cambio	Revisión validada por el organismo notificado
H	Diciembre de 2025	Publicación inicial para su envío al organismo notificado.	<input checked="" type="checkbox"/> Sí Idioma de validación: <b>Inglés</b>  <input type="checkbox"/> No