

Istruzioni per l'uso

IdentiClone[®] Dx

IGH Assay

IVD Per uso diagnostico *in vitro*.

Numero di catalogo

REF 91010101

Prodotto

IdentiClone Dx IGH Assay

UDI

00810022732502

Quantità

33 reazioni

Condizioni di conservazione

-30°C -15°C

Indice

1.	DESTINAZIONE D'USO	3
2.	INDICAZIONI / CONTROINDICAZIONI	3
3.	GLOSSARIO E ABBREVIAZIONI	3
3.1.	Glossario	3
3.2.	Abbreviazioni	4
4.	SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST	5
4.1.	Contesto	5
4.2.	Riepilogo	5
5.	PRINCIPI DELLA PROCEDURA	6
5.1.	Reazione a catena della polimerasi (PCR)	6
5.2.	Rilevamento della fluorescenza	6
5.3.	Analisi con il software	6
5.4.	Utilizzatori finali e ambiente d'uso	6
6.	REAGENTI	7
6.1.	Componenti dei reagenti	7
6.2.	Conservazione e manipolazione dei reagenti	8
6.3.	Avvertenze e precauzioni	8
6.4.	Reagenti, materiali e apparecchiature	9
7.	RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	11
7.1.	Precauzioni	11
7.2.	Sostanze interferenti	11
7.3.	Requisiti e stabilità dei campioni	11
7.4.	Preparazione dei campioni	11
7.5.	Conservazione dei campioni	11
8.	PROCEDURA DEL SAGGIO	12
8.1.	Preparazione della master mix	13
8.2.	Amplificazione PCR	13
8.3.	Preparazione della piastra di rilevamento	14
8.4.	Installazione dei parametri del saggio	15
8.5.	Analisi dei frammenti mediante elettroforesi capillare	18
8.6.	Controllo di qualità	19
9.	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI	20
9.1.	Punti di controllo del software	20
10.	RIPETIZIONI DEL TEST, SE APPLICABILE	21
10.1.	Sessioni non valide	21
10.2.	Campioni non validi in una sessione valida	21
10.3.	Dettagli di mancata riuscita e ripetizione del test	22
11.	LIMITI DELLA PROCEDURA	22
12.	CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI	23
12.1.	Convalida dei campioni – Stabilità dei campioni	23
12.2.	Cut-off clinico	24
12.3.	Sensibilità analitica: limite del bianco (LoB)	25
12.4.	Sensibilità analitica: limite di rilevamento (LoD)	25
12.5.	Specificità analitica: sostanze interferenti	28
12.6.	Specificità analitica: carry-over / contaminazione crociata	29
12.7.	Specificità analitica: studio di precisione intra-laboratorio	29
12.8.	Precisione della misurazione: studio di riproducibilità multi-centrico	30
12.9.	Convalida del flusso di lavoro del saggio – studio sull'estrazione del DNA	31
12.10.	Convalida del flusso di lavoro del saggio – studio sull'input del DNA	33
12.11.	Convalida del flusso di lavoro del saggio – Equivalenza: 3500xL vs 3500xL Dx	34
12.12.	Convalida clinica	35
13.	BIBLIOGRAFIA	38
14.	ASSISTENZA TECNICA E SERVIZIO CLIENTI	38
15.	SIMBOLI	39
16.	AVVISO LEGALE	39
17.	CRONOLOGIA DELLE REVISIONI	39

1. Destinazione d'uso

IdentiClone Dx *IGH* Assay (il "saggio") è un dispositivo diagnostico *in vitro* destinato al rilevamento della clonalità mediante elettroforesi capillare in riarrangiamenti del gene della catena pesante delle immunoglobuline (*IGH*) in campioni di sangue periferico, come metodo aggiuntivo per la diagnosi di pazienti con sospetta patologia linfoproliferativa a cellule B.

Risultati positivi (ossia il rilevamento della clonalità) non devono essere l'unico criterio per determinare la presenza della malattia. Risultati negativi non escludono la patologia linfoproliferativa. Nella diagnosi finale della patologia linfoproliferativa è necessario tenere conto di ulteriori test di laboratorio (ad es. conte di globuli bianchi [WBC], morfologia, immunoistochimica, rilevamento di mutazioni driver, citometria a flusso, ecc.) e della presentazione clinica.

Questo saggio qualitativo non automatizzato è destinato all'uso su ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer e ABI 3500xL Genetic Analyzer.

2. Indicazioni / Controindicazioni

Non sono state identificate controindicazioni.

3. Glossario e abbreviazioni

3.1. Glossario

Tabella 1. Glossario dei termini specifici di IdentiClone Dx *IGH* Assay

Termine	Definizione
Amplicone	Copie moltiplicate di frammenti di DNA create tramite amplificazione (ad es., PCR).
Amplificazione	Produzione di più copie di una sequenza genica o di DNA (ad es., PCR).
Artefatto	Un picco rosso rilevato dall'analisi dei frammenti su ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer che si trova entro 0,5 coppie di basi rispetto ai 5 picchi blu o verdi più alti. Se il picco dell'artefatto è pari o superiore al relativo picco blu o verde, il risultato della master mix (MM) associata sarà considerato non valido.
Clan	I riarrangiamenti del gene <i>IGH</i> vengono identificati da IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay mediante l'uso di primer che mirano ai 7 geni dei sottogruppi IGHV, IGHV1-7. I geni dei sottogruppi IGHV possono essere ulteriormente classificati in clan genici IGHV (clan I, II e III) in base alla loro somiglianza in termini di sequenze. ¹⁵ Il clan I include i geni dei sottogruppi IGHV1, IGHV5 e IGHV7; il clan II include i geni dei sottogruppi IGHV2, IGHV4 e IGHV6; e il clan III include il gene dei sottogruppi IGHV3.
Clonale	<ul style="list-style-type: none"> • Un risultato dell'<i>ID campione</i> (identificazione generale) in cui viene rilevata la clonalità. • Un risultato <i>Nome del campione</i> (per una MM) in cui un picco significativo viene rilevato nell'intervallo dimensionale valido.
Rilevamento	Parte del saggio in cui gli ampliconi vengono separati mediante elettroforesi capillare e rilevati come picchi.
<i>In vitro</i>	Processo che si verifica al di fuori di un organismo vivente.
Indeterminato	Un risultato del campione in cui tutti e 3 i risultati della master mix (MM) hanno generato risultati indeterminati oppure un risultato della MM del campione in cui non è possibile determinare la presenza o l'assenza di clonalità (ossia risultato ambiguo)
Non valido	Un risultato del campione in cui i 3 risultati della master mix non sono validi oppure un risultato della MM del campione che non soddisfa i criteri di validità (Tabella 8).
Patologia linfoproliferativa	Patologia caratterizzata dalla proliferazione anomala dei linfociti.
Prodotto della master mix	Ampliconi generati dall'amplificazione di 3 MM diverse: MM della provetta A <i>IGH</i> (FR1), MM della provetta B <i>IGH</i> (FR2), MM della provetta C <i>IGH</i> (FR3).
Controllo negativo	Soluzione tampone contenente DNA policlonale; si prevede che questo controllo generi un risultato <i>Non clonale con ogni master mix</i> .
Non clonale	Risultato del campione in cui la clonalità non viene rilevata o un risultato della MM del campione in cui non viene rilevato un picco significativo entro l'intervallo dimensionale valido.

Tabella 1. Glossario dei termini specifici di IdentiClone Dx *IGH* Assay

Termine	Definizione
Mappa della piastra	Rappresentazione visiva di una piastra di rilevamento, importata nell'analizzatore genetico ABI. Questo file fornisce una disposizione della piastra a 96 pozzetti contenente le informazioni associate alla sessione, tra cui <i>ID campione</i> , <i>Nome del campione</i> , <i>Tipo di campione</i> e <i>Master Mix</i> per ogni posizione del pozzetto.
Controllo positivo	Soluzione tampone contenente DNA usata per valutare la validità del saggio; si prevede che questo controllo generi un risultato Clonale con ogni master mix.
ID campione	Identificazione univoca associata a un campione del paziente. Ogni <i>ID campione</i> deve essere analizzato con ogni master mix (N = 3) inclusa nel saggio. I risultati della master mix individuale e dei test specifici della sessione vengono identificati con <i>Nome del campione</i> . Ogni <i>ID campione</i> avrà almeno 3 risultati Nome del campione associati. Per un esempio, vedere la Figura 10.
Nome del campione	Identificazione univoca associata alla master mix e ai risultati dei test specifici della sessione associati a un <i>ID campione</i> (campione del paziente). Per un esempio, vedere la Figura 10.
Saturazione	Presenza del picco con unità di fluorescenza relativa (RFU) eccessivamente elevate (≥ 30.000)
Errore di qualità delle dimensioni (SQ)	ABI 3500xL Genetic Analyzer o ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer ha determinato un errore in cui la somiglianza calcolata tra il pattern dei frammenti del colorante dello standard di riferimento specifico e la distribuzione osservata dei picchi dello standard di riferimento in un campione non ha superato la soglia prestabilita.
Picco significativo	Picco dominante che rientra in un intervallo dimensionale valido.

3.2. Abbreviazioni

Tabella 2. Definizioni delle abbreviazioni

Acronimo	Definizione
bp	Base pair (Coppia di basi)
CE	Capillary electrophoresis (Elettroforesi capillare): metodo elettrocinetico utilizzato per separare gli ampliconi in base alle dimensioni.
IC	Intervallo di confidenza
DNA	Acido desossiribonucleico
FNC	File Name Convention (Convenzione di denominazione dei file): un insieme di criteri che definisce come assegnare nomi ai file per descriverne il contenuto e indicarne le relazioni con altri file.
FSA	File dei dati di analisi dei frammenti generato dallo strumento di elettroforesi capillare.
gDNA	DNA genomico
IFU	Instructions for Use (Istruzioni per l'uso)
<i>IGH</i>	Immunoglobulin heavy chain gene (Gene della catena pesante delle immunoglobuline)
<i>IGHFR1/2/3</i>	I framework 1, 2 e 3 conservati del gene <i>IGH</i>
IUO	Investigational Use Only (Solo per uso sperimentale)
IVD	Diagnostica <i>in vitro</i>
LL	Lower limit (Limite inferiore)
LoB	Limit of blank (Limite del bianco)
LoD	Limit of detection (Limite di rilevamento)
MM	Master mix
N/A	Non applicabile
NTC	No template control (Controllo senza template) (acqua): si prevede che questo controllo non generi picchi amplificati entro l'intervallo dimensionale valido.

Tabella 2. Definizioni delle abbreviazioni

Acronimo	Definizione
NPA	Negative percent agreement (Percentuale di concordanza negativa)
OPA	Overall percent agreement (Percentuale di concordanza complessiva)
PB	Peripheral blood (Sangue periferico)
PCR	Polymerase chain reaction (Reazione a catena della polimerasi)
PPA	Positive percent agreement (Percentuale di concordanza positiva)
PPB	Pooled peripheral blood (Sangue periferico raggruppato in pool)
RPR	Relative Peak Ratio (Rapporto di picco relativo), valore utilizzato per determinare la clonalità.
RUO	Research use only (Solo a scopo di ricerca)
SQ	Size Quality (Qualità delle dimensioni): presentazione numerica della somiglianza tra il pattern dei frammenti del colorante dello standard di riferimento specificato nella relativa definizione e la distribuzione effettiva dei picchi dello standard di riferimento nel campione.
XLSX	Formato di file compatibile con le versioni di Office 2010 e successive. Questo formato di file può essere utilizzato per creare il record della piastra su ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer e ABI 3500xL Genetic Analyzer.
XML	File di linguaggio di markup estensibile progettato per memorizzare e trasportare i dati. Questo formato di file viene utilizzato per Parametri dello strumento, Gruppo di risultati e Convenzione di denominazione dei file di IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay per ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer e ABI 3500xL Genetic Analyzer (inclusi con REF 91010111).

4. Sommario e spiegazione del test

4.1. Contesto

Si stima che ogni anno in tutto il mondo vengano diagnosticati oltre 900.000 nuovi casi di patologie linfoproliferative a cellule B, considerando la varietà di malattie che rientra in questa categoria.^{1,2,3} Spesso i disturbi linfoproliferativi a cellule B, come linfomi e leucemie, si verificano a causa della disregolazione dei normali processi di sviluppo delle cellule B, in particolare nei riarrangiamenti del gene della catena pesante delle immunoglobuline (*IGH*).

Durante l'ontogenesi nei linfociti B, il gene *IGH* viene sottoposto a un processo chiamato ricombinazione V(D)J, in cui la variabile (V_H), la diversità (D_H) e i segmenti genici di giunzione (J_H) vengono riarrangiati casualmente.^{4,5} Questi segmenti genici riarrangiati aumentano la diversità genetica, generando circa 10^{12} sequenze di DNA uniche, e consentono al sistema immunitario di riconoscere un'ampia gamma di antigeni.^{4,5,6} Tuttavia, nelle patologie linfoproliferative a cellule B, un singolo clone di cellule B con un particolare riarrangiamento di *IGH* prolifera in modo anomalo, determinando la formazione di una popolazione di cellule B con riarrangiamenti identici (o clonali) del gene *IGH*. Il rilevamento di queste espansioni clonali è una caratteristica distintiva delle neoplasie a cellule B.^{4,5,6,7,8,9}

Quando a questi riarrangiamenti genici si applica la reazione a catena della polimerasi (PCR), per ogni cellula vengono generati prodotti unici in termini di lunghezza e sequenza.^{6,7,8,9} Pertanto, questa metodologia può essere applicata per identificare le popolazioni linfocitarie derivate da una singola cellula, identificando i riarrangiamenti genici V-J esclusivi presenti nel locus *IGH*.^{6,8,9,10} La presenza di riarrangiamenti clonali di *IGH* serve per confermare la diagnosi di patologie linfoproliferative a cellule B, distinguendo le proliferazioni linfoidi maligne da quelle benigne.^{11,12,13,14}

4.2. Riepilogo

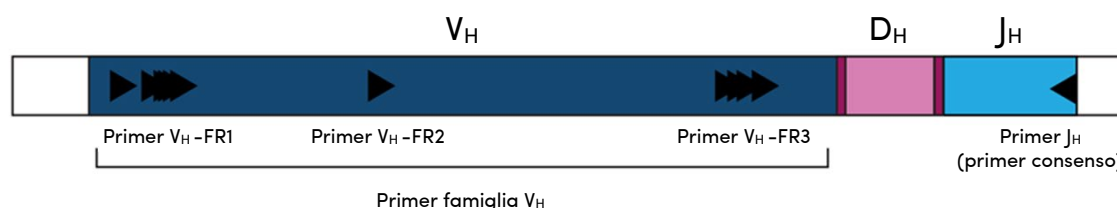
IdentiClone Dx *IGH* Assay comprende tre master mix (MM) per PCR, un controllo positivo (*IGH* POS [+]), un controllo negativo (NEG [-]), un controllo senza template (NTC), DNA polimerasi Taq e il pacchetto IdentiClone Dx *IGH* Software. Le master mix del saggio utilizzano più primer consenso marcati con fluorescenza, progettati per identificare i framework conservati (FR1, 2 e 3) all'interno delle regioni V_H e J_H del locus *IGH*. Dopo l'amplificazione, gli ampliconi marcati con fluoroforo vengono frazionati per dimensione, generando profili degli ampliconi con ogni master mix per PCR. I dati ottenuti vengono quindi caricati su IdentiClone Dx *IGH* Software per l'analisi, al fine di determinare la validità e lo stato di clonalità. Per stabilire lo stato di clonalità di ogni campione, vengono compilati i risultati validi generati da ogni master mix: Clonale, Non clonale, Non valido o Indeterminato.

5. Principi della procedura

5.1. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Poiché la regione variabile (V_H) è soggetta a mutazioni somatiche, è difficile utilizzare un singolo set di primer per PCR per identificare tutte le regioni conservate che fiancheggiano i riarrangiamenti di V_H - J_H . Per questo motivo, IdentiClone Dx *IGH* Assay utilizza più primer consenso per PCR che identificano tre framework (FR1, FR2 e FR3) e la regione J_H del gene *IGH*. I primer consenso sono coniugati a coloranti fluorescenti e sono contenuti in tre singole master mix: MMA, MMB e MMC. (Figura 1) Queste master mix amplificano i tre framework (FR) e le due regioni che determinano la complementarità (CDR) dal DNA genomico (gDNA) isolato dal campione di sangue periferico.

Figura 1. L'organizzazione di un gene della catena pesante delle immunoglobuline riarrangiato sul cromosoma 14. Le frecce nere rappresentano le posizioni relative dei primer che identificano il framework conservato (FR1/2/3) e i segmenti del gene J_H consenso a valle. I prodotti di ampliconi generati da ciascuna di queste regioni possono essere rilevati quando si usano serie di primer fluorescenti con strumenti di elettroforesi capillare che impiegano il rilevamento di fluorescenza.



Primer **MMA** *IGH* FR1 + primer consenso J_H

Primer **MMB** *IGH* FR2 + primer consenso J_H

Primer **MMC** *IGH* FR3 + primer consenso J_H

5.2. Rilevamento della fluorescenza

Dopo l'amplificazione, ogni prodotto della PCR viene elaborato su ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer o ABI 3500xL Genetic Analyzer, in cui gli ampliconi marcati con fluoroforo vengono frazionati in base alla dimensione.

I parametri della sessione specifici del saggio, come le impostazioni dello strumento, il gruppo di risultati e la convenzione di denominazione dei file, sono inclusi come file XML nel pacchetto IdentiClone Dx *IGH* Software e devono essere configurati prima di eseguire il saggio per la prima volta. Una volta configurati, i profili degli ampliconi di ogni master mix per PCR vengono raccolti in formato file FSA e caricati su IdentiClone Dx *IGH* Software per l'interpretazione.

5.3. Analisi con il software

IdentiClone Dx *IGH* Software è progettato per integrare IdentiClone Dx *IGH* Assay ed eliminare la soggettività dall'interpretazione dell'elettroferogramma. I file di dati grezzi generati dagli ampliconi del saggio con rilevamento della fluorescenza vengono analizzati per la validità e lo stato di clonalità, facendo riferimento a una mappa della piastra configurata per la tracciabilità dei campioni.

Poiché per questo saggio occorrono tre master mix per determinare lo stato di clonalità, si utilizza una gerarchia di denominazione per correlare i risultati della master mix (identificati da un *Nome del campione*) al campione del paziente, identificato da un *ID campione* (Figura 9). Ogni serie di test della master mix, compresi i campioni, un controllo positivo, un controllo negativo e un controllo senza template, viene considerata una "sessione" e può essere configurata individualmente utilizzando la funzione di impostazione della piastra del software e caricata sulla stessa piastra, contenente altre sessioni. Una volta completato il rilevamento, i file di dati vengono caricati nel software, che procede con l'analisi, facendo riferimento alla mappa della piastra per completare l'analisi intermedia per quella master mix. Se le sessioni per tutte e tre le master mix sono ritenute valide, si procede all'elaborazione dei dati per generare risultati intermedi, rappresentati dai *Nomi dei campioni*, che vengono visualizzati e che consentono all'operatore di scegliere e generare lo stato di clonalità per ogni *ID campione*. Per ulteriori dettagli, consultare le relative IFU di IdentiClone Dx *IGH* Software.

5.4. Utilizzatori finali e ambiente d'uso

- 5.4.1. Il dispositivo è riservato esclusivamente all'uso professionale in un laboratorio clinico.
- 5.4.2. Il dispositivo non è destinato all'uso per test vicino al paziente né all'auto-test.
- 5.4.3. Il dispositivo non è classificato come saggio diagnostico di accompagnamento.

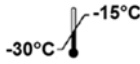

6. Reagenti

6.1. Componenti dei reagenti

Tabella 3. Kit disponibili

Numero di catalogo	Descrizione	Quantità
REF 91010101	IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay	33 reazioni

Tabella 4. Componenti dei reagenti (componenti del kit)

Reagente	Codice articolo	Componenti dei reagenti (principi attivi)	Quantità unitaria	N. di unità	Temperatura di conservazione
Master mix	REF 21010191	MMA <i>IGH</i> FR1 Oligonucleotidi multipli per la regione framework 1 del gene della catena pesante delle immunoglobuline in soluzione salina tamponata.	1500 µl	1	
	REF 21010201	MMB <i>IGH</i> FR2 Oligonucleotidi multipli per la regione framework 2 del gene della catena pesante delle immunoglobuline in soluzione salina tamponata.	1500 µl	1	
	REF 21010211	MMC <i>IGH</i> FR3 Oligonucleotidi multipli per la regione framework 3 del gene della catena pesante delle immunoglobuline in soluzione salina tamponata.	1500 µl	1	
DNA di controllo positivo <i>IGH</i>	REF 40883460	CONTROL + <i>IGH</i> gDNA da cellule in coltura in soluzione salina tamponata	100 µl	1	
DNA di controllo negativo	REF 40920070	CONTROL - gDNA da cellule in coltura in soluzione salina tamponata	100 µl	1	
Controllo senza template (NTC)	REF 40930010	CONTROL NTC Acqua	100 µl	1	
DNA polimerasi FalconTaq®	REF 60970150	TAQ Enzima della DNA polimerasi FalconTaq	50 µl	1	
Pacchetto IdentiClone Dx <i>IGH</i> Software	REF 91010111	IdentiClone Dx <i>IGH</i> Software <ul style="list-style-type: none"> IdentiClone-Dx-<i>IGH</i>-Software-1.2.x.IVD.msi Parametri di IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay <ul style="list-style-type: none"> IGH_IP.xml IGH_FNC.xml IGH_RG.xml 	1 pacchetto software	1	

6.2. Conservazione e manipolazione dei reagenti

- 6.2.1. Se non si utilizza immediatamente, **conservare il kit del saggio a una temperatura compresa tra -30°C e -15°C.**
 - 6.2.1.1. Conservare le master mix per PCR al buio, per proteggere i primer marcati con fluoroforo.
- 6.2.2. All'apertura del kit del saggio, ispezionare visivamente ogni reagente per escludere la presenza di danni e/o perdite.
- 6.2.3. Scongelare e agitare accuratamente in vortex tutti i reagenti e i controlli prima dell'uso, assicurandosi che siano completamente risospesi e omogenei.

IMPORTANTE! **L'agitazione eccessiva in vortex può frammentare il DNA e causare il distacco dei fluorofori dai primer marcati. NON agitare in vortex la provetta contenente DNA polimerasi Taq.**

- 6.2.3.1. Agitare in vortex alla velocità massima per 5–15 secondi.
- 6.2.3.2. Centrifugare per 2–5 secondi.
- 6.2.3.3. Se conservati e manipolati secondo le istruzioni, i materiali aperti sono stabili per 6 mesi, o 5 cicli di congelamento-scongelo, o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Non usare i kit oltre la data di scadenza.

6.3. Avvertenze e precauzioni

IVD Questo prodotto è esclusivamente per uso professionale.

- 6.3.1. Usare il kit del saggio come un sistema. Non usare reagenti di altri fabbricanti. La diluizione, la riduzione dei volumi di reazione o qualsiasi altra deviazione da questo protocollo può compromettere le prestazioni del test e/o invalidare eventuali sublicenze limitate associate all'acquisto del kit di analisi.
- 6.3.2. Il rispetto del protocollo garantirà prestazioni e riproducibilità ottimali. È importante usare il programma del termociclatore corretto, poiché altri programmi potrebbero fornire dati imprecisi/errati, ad es., risultati falsi positivi e falsi negativi.
- 6.3.3. Smaltire i reagenti inutilizzati e i rifiuti in conformità alle normative nazionali, statali e locali.
- 6.3.4. Non miscelare o combinare reagenti provenienti da kit con numeri di lotto diversi.
- 6.3.5. Quando si lavora con i campioni occorre indossare adeguati dispositivi di protezione individuale e seguire le buone pratiche di laboratorio e le precauzioni universali. I campioni devono essere sempre manipolati in strutture di contenimento per la sicurezza biologica approvate e vanno aperti solo in cappe di biosicurezza certificate.
- 6.3.6. A causa della sensibilità analitica di questo test, è necessario prestare la massima attenzione per evitare la contaminazione dei reagenti e/o delle miscele di amplificazione con campioni, controlli o materiali amplificati. Tutti i reagenti devono essere monitorati per individuare segni di contaminazione (ad es., controlli negativi che danno segnali positivi). Smaltire i reagenti di cui si sospetta la contaminazione.
- 6.3.7. Per ridurre al minimo la contaminazione, indossare guanti puliti quando si manipolano campioni e reagenti e pulire regolarmente le aree di lavoro e le pipette prima di eseguire la PCR.
- 6.3.8. La sterilizzazione in autoclave non elimina la contaminazione del DNA.
- 6.3.9. Il flusso di lavoro nel laboratorio di PCR è unidirezionale tra le distinte aree di lavoro: iniziare con la preparazione del campione, passare alla preparazione della master mix, quindi all'amplificazione e infine al rilevamento. Non portare gli ampliconi (ossia la piastra per PCR dopo l'amplificazione) nelle aree designate per la preparazione della master mix o del campione.
- 6.3.10. Conservare tutte le pipette, i puntali e ogni altra apparecchiatura utilizzata in un'area dedicata esclusivamente a quella zona del laboratorio.
- 6.3.11. Quando possibile, usare materiale da laboratorio in plastica sterile monouso per evitare la contaminazione con RNasi e DNasi o la contaminazione crociata.
- 6.3.12. Quando un sacchetto in polimero POP-7 raggiunge la temperatura ambiente, esaminarlo all'interno del collo, nel punto di installazione. Assicurarsi che il sacchetto sia privo di polimero essiccato o cristallizzato. Non installare il sacchetto su ABI 3500XL Dx Genetic Analyzer se si nota la presenza di cristallizzazione, poiché ciò può compromettere le prestazioni del saggio e/o dello strumento. Contattare l'assistenza clienti Thermo Fisher Scientific.
- 6.3.13. Ogni incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente nello Stato membro dell'utilizzatore e/o del paziente.

6.4. Reagenti, materiali e apparecchiature

Eseguire la manutenzione di tutte le apparecchiature secondo le istruzioni del fabbricante. La Tabella 5 elenca i reagenti, i materiali e le apparecchiature necessari non forniti nel kit.

Tabella 5. Reagenti, materiali e apparecchiature necessari (non forniti)

Reagente / Materiale / Apparecchiatura	Fornitori e reagenti / Materiali / Apparecchiature raccomandati	Note
Strip di 8 tappi	N/A	Senza inibitori di PCR, DNasi, RNasi
Setti a 96 pozzetti	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Setti per 3500xL Dx Genetic Analyzer, 96 pozzetti Setti per piastre a 96 pozzetti, per 3500/SeqStudio™ Flex 	N/A
Foglio in alluminio sigillante adesivo per	N/A	Senza DNasi, RNasi
Anode Buffer Container	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Anode Buffer Container per 3500 Dx Genetic Analyzer/3500xL Genetic Analyzer Anode Buffer Container (ABC), per 3500/SeqStudio Flex 	Senza DNasi, RNasi
Pipette calibrate	N/A	Devono essere in grado di misurare con precisione volumi compresi tra 1 µl e 1000 µl
Array capillare	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Array di 24 capillari per 3500xL Dx Genetic Analyzer, 50 cm Array di 24 capillari per 3500xL Genetic Analyzer, 50 cm 	N/A
Strumento di elettroforesi capillare	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> (UE) 3500xL Dx Genetic Analyzer con 3500 Dx Series Data Collection Software 3 IVD v3.0 (USA) 3500xL Dx Genetic Analyzer con 3500 Dx Series Data Collection Software 3 IVD v3.2 3500xL Genetic Analyzer con 3500 Series Data Collection Software v1.0 	Assicurarsi che lo strumento sia calibrato con Matrix Standard Kit (Dye Set G5) DS-33 con GeneScan 600 LIZ Size Standard v2.0
Cathode Buffer Container	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Cathode Buffer Container per 3500 Dx Genetic Analyzer/3500xL Genetic Analyzer Cathode Buffer Container (CBC), per 3500/SeqStudio Flex 	N/A
Setti per Cathode Buffer	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Cathode Buffer Container con setti per 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzers Cathode Buffer Container con setti, per 3500 e SeqStudio Flex 	N/A
Reagente di condizionamento	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Reagente di condizionamento per 3500 Dx Genetic Analyzer/3500xL Dx Genetic Analyzer Reagente di condizionamento, per 3500/SeqStudio Flex 	N/A
Puntali per pipette con filtro	N/A	Sterili, apirogeni, senza RNasi/DNasi

Tabella 5. Reagenti, materiali e apparecchiature necessari (non forniti)

Reagente / Materiale / Apparecchiatura	Fornitori e reagenti / Materiali / Apparecchiature raccomandati	Note
Hi-Di Formamide	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Hi-Di™ Formamide, 3500 Dx Series Hi-Di Formamide 	N/A
Provette a basso legame	N/A	Per la conservazione di gDNA; senza inibitori di RNasi, DNasi, DNA, PCR
LIZ Size Standard	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard v2.0 – Dx GeneScan 600 LIZ dye Size Standard v2.0 	N/A
Microcentrifuga	N/A	Sterile
Spettrofotometro UV-Vis a microvolumi	N/A	In grado di misurare l'assorbanza a 260 nm per il calcolo della concentrazione degli acidi nucleici
Piastre o provette per PCR	N/A	Senza inibitori di RNasi, DNasi, DNA, PCR
Centrifuga per piastre	N/A	Centrifuga con capacità di 1000 RCF
Polimero POP-7	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> POP-7™ (384) Performance Optimized Polymer 3500 Dx Series Polimero POP-7, per 3500/SeqStudio™ Flex 	N/A
Retainer and Base Set	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Retainer and Base Set (Standard) per 3500 Dx Genetic Analyzer /3500xL Dx Genetic Analyzer, 96 pozzetti Retainer & Base Set (Standard) per 3500 Genetic Analyzer/3500xL Genetic Analyzer, 96 pozzetti 	N/A
Acqua sterile	N/A	Sterile, senza RNasi/DNasi
Termociclatore	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Veriti™ Dx 	N/A
Tampone Tris-EDTA (TE)	N/A	Soluzione di Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 ed EDTA 1 mM Nota: diluire 1:10 con acqua
Agitatore vortex	N/A	N/A

Contattare il fabbricante per i codici articolo nella propria regione.

7. Raccolta e preparazione dei campioni

7.1. Precauzioni

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

7.2. Sostanze interferenti

È noto che le seguenti sostanze interferiscono con l'amplificazione della PCR; evitare, se possibile:

- 7.2.1. Chelanti cationici divalenti
- 7.2.2. Puntali per pipette a bassa ritenzione
- 7.2.3. EDTA (non significativo a basse concentrazioni)
- 7.2.4. Eparina

7.3. Requisiti e stabilità dei campioni

Questo saggio richiede almeno 0,5 ml di sangue periferico anticoagulato con EDTA.

- 7.3.1. Il campione può essere conservato a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C fino a 7 giorni prima dell'analisi.
- 7.3.2. Il campione può essere spedito con ghiaccio; non deve mai essere congelato.

7.4. Preparazione dei campioni

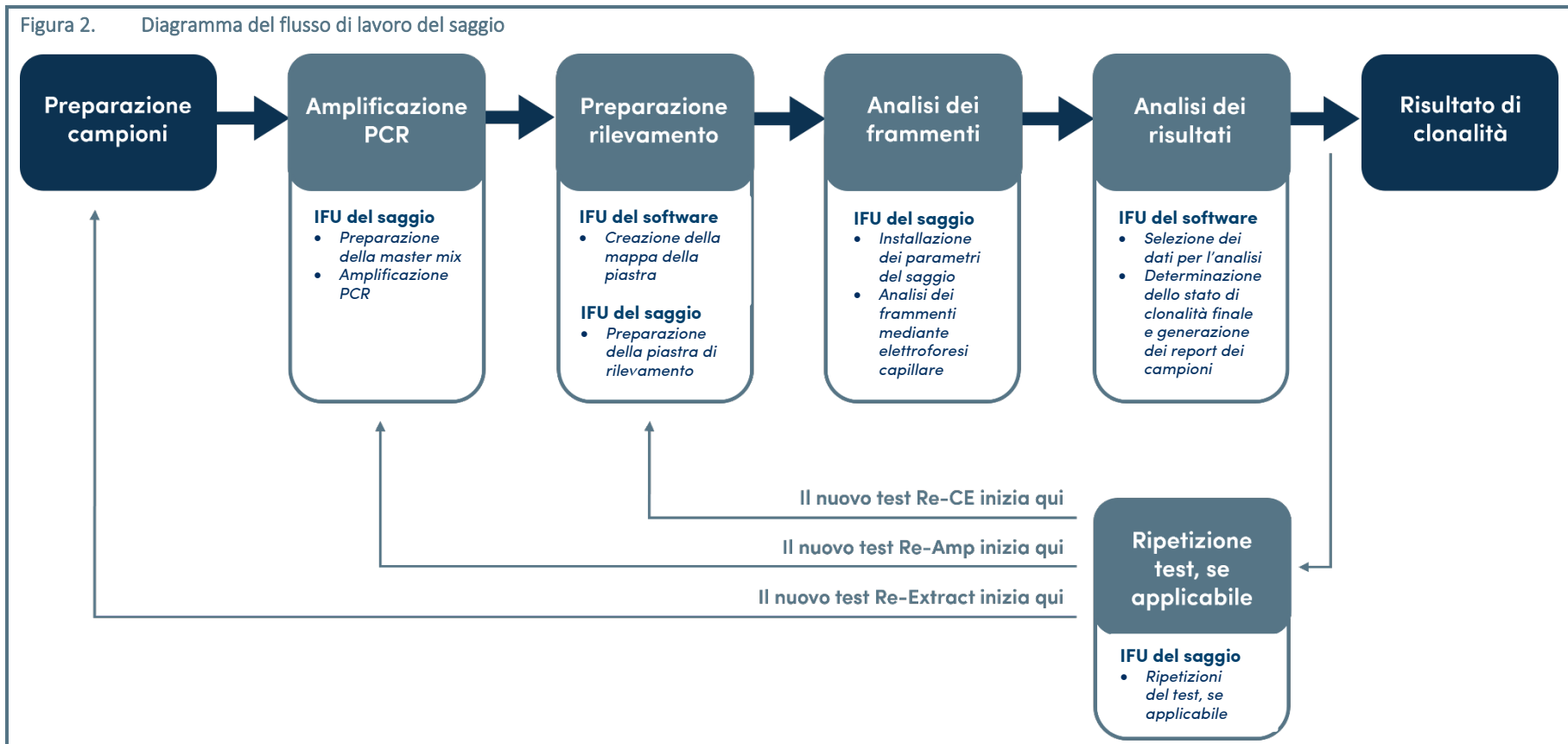
- 7.4.1. Estrarre il gDNA dai campioni <7 giorni dalla raccolta.
- 7.4.2. Quantificare il gDNA estratto utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis a microvolumi.
- 7.4.3. Preparare una diluizione di gDNA in 50 ng/μl con TE 1/10.
 - 7.4.3.1. Per l'amplificazione con ogni master mix, sono necessari 5 μl di gDNA a una concentrazione di 50 ng/μl.
 - Preparare almeno 15 μl–20 μl di gDNA diluito.
 - 7.4.3.2. Se la concentrazione di gDNA disponibile è <50 ng/μl, estrarre nuovamente i campioni dei pazienti.

7.5. Conservazione dei campioni

- 7.5.1. Conservare il gDNA a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C fino a 7 giorni prima dell'uso o tra -30°C e -15°C fino a 3 anni prima dell'uso.
- 7.5.2. Conservare i campioni di gDNA diluiti in provette a basso legame.

8. Procedura del saggio

Nota: questo saggio richiede l'utilizzo di questo documento insieme alle IFU di IdentiClone Dx IGH Software.



8.1. Preparazione della master mix

- Includere i controlli della sessione analitica (Controlli positivi, negativi e Senza template) in ogni sessione
 - Per l'analisi con ogni master mix è necessario un replicato del campione.
- 8.1.1. Rimuovere le master mix, il controllo positivo, il controllo negativo, l'NTC e il campione di gDNA diluito (50 ng/μl) dal luogo di conservazione e far scongelare completamente le provette a temperatura ambiente; quindi, agitare in vortex alla velocità massima per circa 15 secondi
- 8.1.2. Rimuovere la DNA polimerasi Taq dal luogo di conservazione e conservarla al freddo (ossia su ghiaccio o su un blocco freddo).

IMPORTANTE! **NON agitare in vortex la provetta con l'enzima della DNA polimerasi Taq.**

- 8.1.2.1. Centrifugare le provette per 2–5 secondi in una microcentrifuga.

Nota: le fasi di centrifugazione sono necessarie per raccogliere tutto il liquido sul fondo di una provetta o di un pozzetto della piastra. È possibile usare velocità e tempi approssimativi solo quando l'operatore conferma visivamente la riuscita della raccolta. Le velocità e le durate elencate sono incluse come raccomandazioni.

- 8.1.3. Usare le linee guida riportate di seguito per calcolare il numero totale di reazioni (N) per ogni master mix:
- Includere almeno un volume di reazione aggiuntivo per tenere conto dell'errore di pipettaggio.

n	n. di campioni
+ 1	DNA di controllo positivo (IGH POS [+])
+ 1	DNA di controllo negativo (NEG [-])
+ 1	Controllo senza template (NTC)
+ 1	Volume di reazione aggiuntivo
N = (n + 4)	N. di campioni + 3 controlli + 1 volume di reazione aggiuntivo

- 8.1.3.1. Aggiungere il volume calcolato per ogni master mix in provette etichettate separate, utilizzando **N × 45 μl**.
- 8.1.3.2. Aggiungere il volume calcolato di DNA polimerasi Taq a ogni master mix, utilizzando **N × 0,25 μl**.
- 8.1.3.3. Agitare in vortex le soluzioni master mix + DNA polimerasi Taq alla velocità massima per 5-15 secondi.
- NON agitare in vortex la DNA polimerasi Taq prima di aggiungerla a ogni master mix. Agitare in vortex solo dopo la formulazione con la master mix.
- 8.1.3.4. Centrifugare le provette per 2–5 secondi in una microcentrifuga.
- 8.1.4. Per ogni reazione, combinare 45 μl della soluzione (o delle soluzioni) di MM + DNA polimerasi Taq con 5 μl di template (campione diluito di gDNA in 50 ng/μl, controllo positivo, controllo negativo o NTC) in pozzetti individuali appropriati in una piastra o provetta (o provette) per PCR.
- 8.1.4.1. Pipettare più volte, quindi chiudere la provetta o sigillare la piastra con strip di tappi o con foglio in alluminio sigillante; OPPURE
- 8.1.4.2. Chiudere la provetta o sigillare la piastra con strip di tappi o con foglio in alluminio sigillante, quindi agitare in vortex alla velocità massima per circa 15 secondi.
- 8.1.4.3. Se si utilizza una provetta per PCR, centrifugare la provetta (o le provette) per 2–5 secondi in una microcentrifuga. Se si utilizza la piastra per PCR, centrifugarla a 1000 RCF per circa 30 secondi.

8.2. Amplificazione PCR

- 8.2.1. Amplificare la provetta (o le provette) o la piastra in base ai parametri della PCR riportati nella Tabella 6.
- 8.2.1.1. Assicurarsi che il *Volume di reazione* sia impostato su **50 μl** e che la *Temperatura di copertura* sia impostata su **105°C**.
- 8.2.1.2. Assicurarsi che il *Volume di reazione* sia impostato su **50 μl** e che la *Temperatura di copertura* sia impostata su **105°C**.
- 8.2.2. Una volta completato il programma di PCR, rimuovere la piastra di amplificazione o le provette dal termociclatore.
- 8.2.2.1. I prodotti della PCR possono essere conservati tra 2°C e 8°C fino a 7 giorni o tra -30°C e -15°C fino a 3 mesi prima del rilevamento.
- 8.2.2.2. Attenersi alla sezione *Creazione della mappa della piastra* nelle IFU del software per creare una mappa della piastra prima di passare alla sezione 8.3.

Tabella 6. Parametri della PCR

Fase	Temperatura	Tempo	Cicli	Velocità di rampa
1	95 °C	7 minuti	1	75%
2	95 °C	45 secondi	35	
3	60 °C	45 secondi		
4	72 °C	90 secondi		
5	72 °C	10 minuti	1	
6	15 °C	∞	Mantenimento	

8.3. Preparazione della piastra di rilevamento

Nota: assicurarsi che la mappa della piastra sia stata creata attenendosi alla sezione *Creazione della mappa della piastra* nelle IFU del software.

8.3.1. Far scongelare un numero adeguato di provette di Hi-Di Formamide a temperatura ambiente.

- La dimensione unitaria di Hi-Di Formamide, 3500 Dx Series è di 5 ml.

Nota: per evitare cicli di congelamento/scongelamento, Hi-Di Formamide può essere scongelata, miscelata e aliquotata in provette da 2 ml a un volume di 1 ml e conservata secondo le istruzioni del fabbricante.

8.3.2. Rimuovere una provetta di LIZ Size Standard v2.0 Dx dal luogo di conservazione.

8.3.3. Agitare in vortex Hi-Di Formamide e lo standard di riferimento LIZ alla velocità massima per 5–15 secondi.

8.3.4. Centrifugare le provette per circa 2–5 secondi.

8.3.5. In una nuova provetta adatta al volume, combinare la quantità richiesta di Hi-Di Formamide con LIZ Size Standard.

8.3.5.1. Il rapporto finale deve essere di **0,056** (56 µl di LIZ Size Standard + 1000 µl di Hi-Di Formamide).

- Assicurarsi che il volume della soluzione LIZ:Hi-Di sia sufficiente per aliquotare 19 µl per ciascuna reazione.

8.3.5.2. Agitare in vortex la soluzione alla velocità massima per 5–15 secondi, quindi centrifugare per 2–5 secondi.

8.3.6. Centrifugare la piastra o le provette di amplificazione della sezione 8.2.2 a 1000 RCF per 30 secondi.

8.3.7. In una nuova piastra per PCR a 96 pozzetti, combinare 19 µl di soluzione LIZ:Hi-Di con 1 µl di prodotto della PCR per ciascun pozzetto.

- Verificare che sia presente un solo tipo di templat di reazione (*ossia* campione, Controllo positivo, Controllo negativo, Controllo senza templat) per ciascun pozzetto.

8.3.8. Aggiungere 20 µl di Hi-Di Formamide a tutti i pozzetti vuoti all'interno dell'iniezione a 24 pozzetti.

- Ogni iniezione sullo strumento ABI 3500xL Dx o ABI 3500xL Genetic Analyzer valuta 24 pozzetti alla volta.

8.3.9. Miscelare la piastra di rilevamento in uno dei modi seguenti:

8.3.9.1. Pipettare su e giù più volte, quindi sigillare la piastra con strip di tappi o con foglio in alluminio sigillante;

OPPURE

8.3.9.2. Sigillare la piastra con strip di tappi o con foglio in alluminio sigillante, quindi agitare in vortex alla velocità massima per 15 secondi.

8.3.9.3. Centrifugare la piastra a 1000 RCF per 30 secondi.

8.3.9.4. Denaturare la piastra di rilevamento utilizzando i parametri riportati nella Tabella 7 sul termociclatore.

Nota: fare riferimento alla sezione 8.3.1 per confermare che i volumi dei reagenti ABI siano sufficienti per la sessione.

Tabella 7. Parametri di denaturazione

Fase	Temperatura	Tempo	Cicli	Velocità di rampa
1	95°C	3 minuti	1	75%
2	4°C	5 minuti	1	

8.3.9.5. Assicurarsi che il *Volume di reazione* sia impostato su **20 µl** e che la *Temperatura di copertura* sia impostata su **105°C**.

8.3.10. Avviare la sessione.

8.3.10.1. Al termine del programma di denaturazione, rimuovere la piastra di rilevamento dal termociclatore e centrifugarla a 1000 RCF per 30 secondi.

8.4. Installazione dei parametri del saggio

I parametri del saggio possono essere importati dal file *IGH-IP.xml* fornito, incluso nel pacchetto IdentiClone Dx IGH Software (REF 91010111) e richiedono *ABI 3500 Dx Series Data Collection Software 3 IVD Library*.

Nota: la sezione 8.4 è obbligatoria per il primo utilizzo di questo saggio con qualsiasi strumento ABI.
Nota: confermare che i Parametri del saggio siano impostati correttamente prima di passare alla sezione 8.5.

IMPORTANTE! I parametri dello strumento e del Protocollo di identificazione delle dimensioni stabiliranno il modo in cui i campioni saranno processati (ossia l'analisi dei frammenti). Per un'esecuzione corretta del saggio è essenziale accertarsi che i parametri corretti vengano salvati con il nome del saggio corretto (*IGH Instrument Parameters [Parametri dello strumento IGH]*).

- 8.4.1. Importare i Parametri dello strumento di IdentiClone Dx IGH Assay nello strumento ABI.
 - 8.4.1.1. Fare doppio clic sull'icona **ABI 3500 Dx** per aprire 3500 Dx Series Data Collection Software 3 IVD.
 - 8.4.1.1.1. Dal menu della dashboard, fare clic su **Library (Libreria)** (Library).
 - 8.4.1.1.2. Fare clic su **Manage (Gestisci)** (Manage), quindi selezionare **Assays (Saggi)** dal menu a discesa.
 - 8.4.1.1.2.1. Selezionare l'icona **Import (Importa)** (Import), quindi andare al percorso file per il pacchetto software e selezionare *IGH-IP.xml*.
- 8.4.2. Importare la Convenzione di denominazione dei file di IdentiClone Dx IGH Assay nello strumento ABI.
 - 8.4.2.1.1. Fare clic su **Manage (Gestisci)** (Manage), quindi selezionare **File Name Convention (Convenzione di denominazione dei file)** dal menu a discesa.
 - 8.4.2.1.1.1. Selezionare l'icona **Import (Importa)** (Import), quindi navigare fino al percorso del file per il pacchetto software e selezionare *IGH-FNC.xml*.
- 8.4.3. Importare il Gruppo di risultati di IdentiClone Dx IGH Assay nello strumento ABI.
 - 8.4.3.1.1. Fare clic su **Manage (Gestisci)** (Manage), selezionare **Results Group (Gruppo di risultati)** dal menu a discesa.
 - 8.4.3.1.1.1. Selezionare l'icona **Import (Importa)** (Import), quindi andare al percorso file per il pacchetto software e selezionare *IGH-RG.xml*.
- 8.4.4. Verificare che il corretto *Instrument protocol (Protocollo dello strumento)* (Figura 3) e i parametri corretti di *Sizecalling Protocol (Protocollo di identificazione delle dimensioni)* (Figura 4) siano configurati e salvati correttamente in Assay Library (Libreria dei saggi) sull'ABI 3500 Data Collection Software.

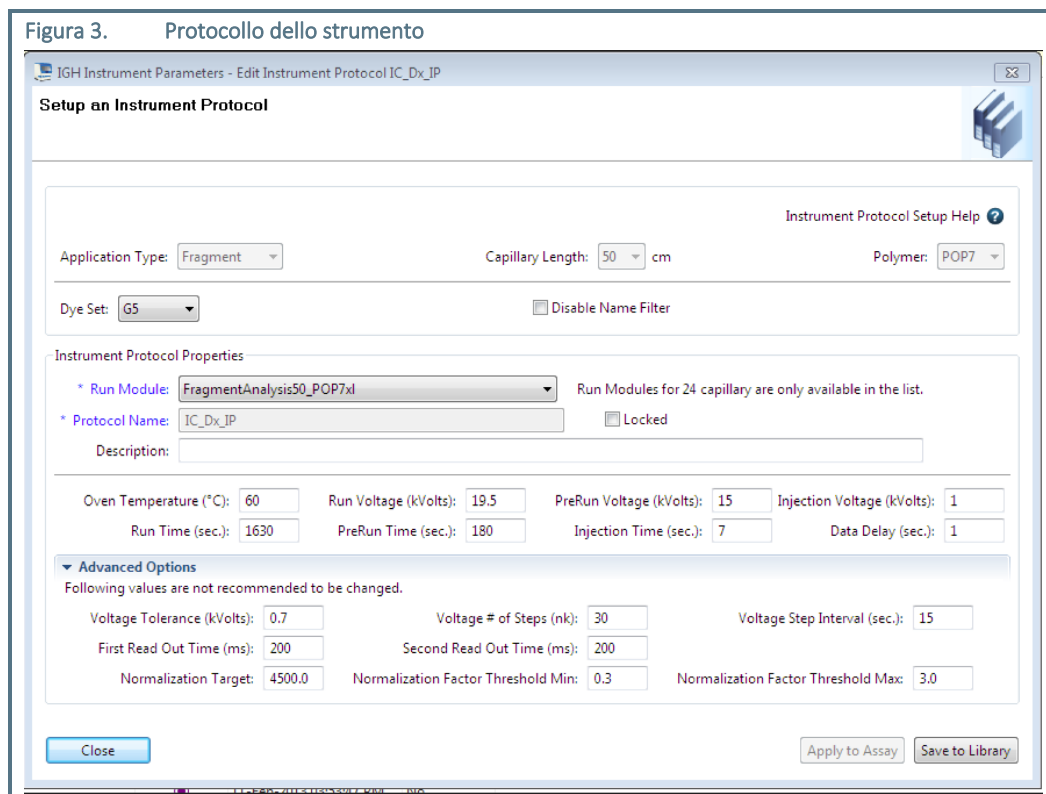
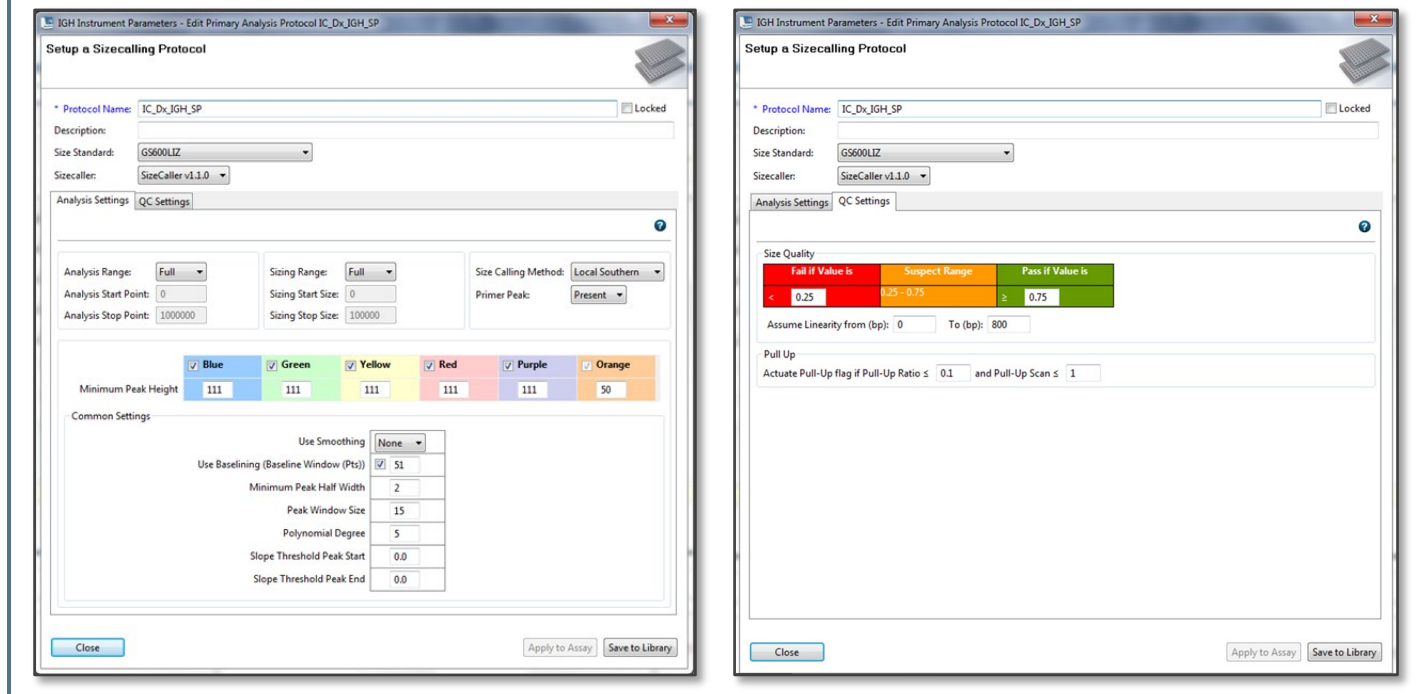
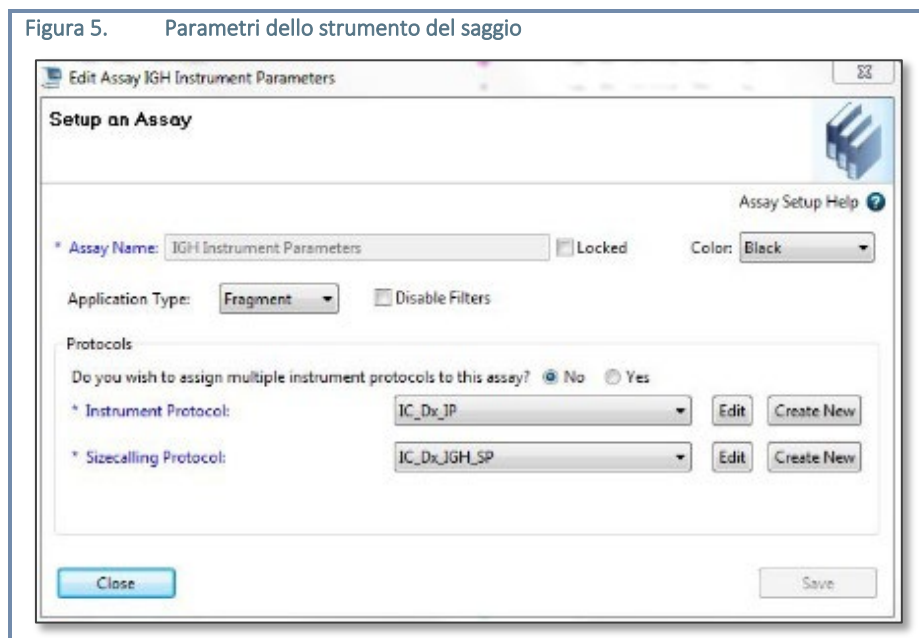



Figura 4. Schede del Protocollo di scaling delle dimensioni



- 8.4.4.1. Salvare i Parametri del saggio nella libreria dei saggi di ABI 3500 Dx utilizzando il nome *IC_Dx_IP* per il Protocollo dello strumento e *IC_Dx_IGH_SP* per il Protocollo di identificazione delle dimensioni, **esattamente** come mostrato nella Figura 5.


Figura 5. Parametri dello strumento del saggio



- 8.4.4.2. Dalla sezione *File Name Conventions (Convenzioni di denominazione dei file)*, fare clic sull'icona della matita  per assicurarsi che le impostazioni della Convenzione di denominazione dei file (FNC) corrispondano a quelle nella Figura 6 e che siano salvate come *IC_Dx_FNC* (esattamente come mostrato).
- 8.4.4.2.1. L'FNC determina quali campi di dati e in quale ordine saranno contenuti nei file di dati ottenuti (file FSA).
- 8.4.4.2.2. Verificare che gli attributi selezionati corrispondano all'ordine mostrato nella Figura 6.

IMPORTANTE: confermare che il campo **Sample Name (Nome del campione)** sia il primo nell'elenco **Selected Attributes (Attributi selezionati)**.

Figura 6. Attributi della *Convenzione di denominazione dei file*

- 8.4.5. Dalla sezione *Results Group (Gruppo di risultati)*, fare clic sull'icona della **matita**  per assicurarsi che le impostazioni di *Results Group (Gruppo di risultati)* (RG) corrispondano a quelle nella Figura 7 e siano salvate come **IC_Dx_RG (esattamente come mostrato)**.
- 8.4.5.1. Il Gruppo di risultati viene utilizzato per denominare, ordinare e personalizzare le cartelle in cui sono memorizzati i file di dati dei campioni.
- 8.4.5.2. Verificare che gli attributi selezionati corrispondano all'ordine mostrato nella Figura 7.

IMPORTANTE: impostare correttamente la **Convenzione di denominazione dei file e il Gruppo di risultati come indicato in precedenza, per evitare errori di analisi dei dati.**

Figura 7. Attributi di *Results Group (Gruppo di risultati)*

8.5. Analisi dei frammenti mediante elettroforesi capillare

8.5.1. Rivedere lo stato dei materiali di consumo dello strumento.

8.5.1.1. Dalla dashboard dello strumento ABI, fare clic su **Refresh (Aggiorna)**, quindi controllare il tempo restante dello strumento e il numero di iniezioni eseguite per i materiali di consumo (Figura 8) e verificare quanto segue:

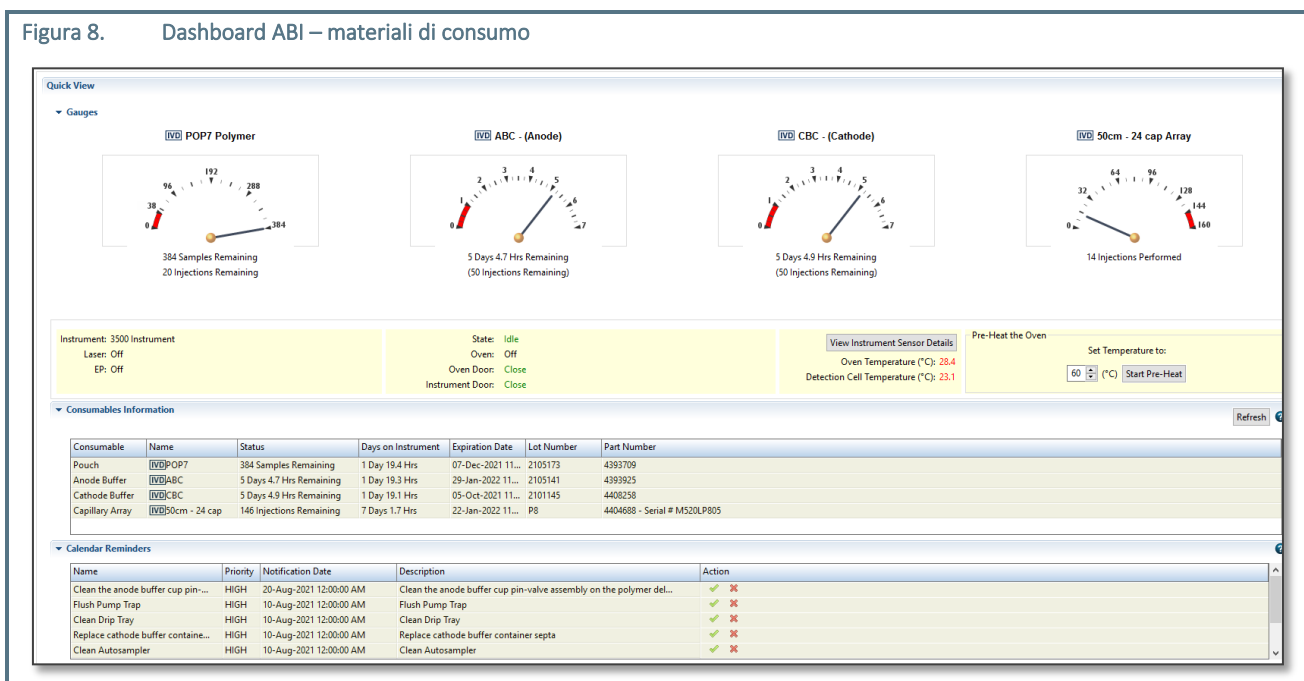
8.5.1.1.1. Presenza di volumi sufficienti di reagente ABI per le sessioni di elettroforesi capillare (CE).

8.5.1.1.2. Tamponi, polimeri e capillari non hanno superato il tempo massimo consentito sullo strumento

8.5.1.1.3. Il numero di iniezioni rimanenti per ogni componente è sufficiente per il numero di iniezioni necessarie per la sessione (o le sessioni) CE.

8.5.1.1.4. Il POP7 rimanente è sufficiente per il numero di campioni nella sessione o nelle sessioni.

8.5.1.2. Se un materiale di consumo è scaduto o deve essere sostituito, seguire le istruzioni del fabbricante per eseguire la manutenzione necessaria prima di procedere.



8.5.1. Importare la mappa della piastra ABI completata (CSV) creata con IdentiClone Dx IGH Software (consultare la sezione *Creazione della mappa della piastra* nelle IFU del software).

IMPORTANTE! Verificare che sia stato creato un file LIPS quando è stata generata la mappa della piastra. Se manca il file LIPS, IdentiClone Dx IGH Software NON sarà in grado di eseguire l'analisi dei risultati.

8.5.1.1. Fare clic su **Create New Plate (Crea nuova piastra)** e immettere un nome per la piastra.

8.5.1.2. Selezionare **96** come *Number of Wells (Numero di pozzetti)*.

8.5.1.3. Selezionare **Fragment (Frammento)** per *Plate Type (Tipo di piastra)*.

8.5.1.4. Selezionare **50 cm** come *Capillary Length (Lunghezza capillare)*.

8.5.1.5. Selezionare **POP7** come *Polymer Type (Tipo di polimero)*.

8.5.1.6. Fare clic su **Assign Plate Contents (Assegna contenuto piastra)**.

8.5.1.7. Fare clic su **Import (Importa)**.

8.5.2. Verificare che siano stati importati gli attributi corretti per la mappa della piastra.

8.5.2.1. Aprire la mappa della piastra ABI (CSV) creata con IdentiClone Dx IGH Software.

8.5.2.1.1. Verificare che tutti i pozzetti dei campioni e dei controlli siano denominati correttamente e che a ogni pozzetto siano state effettuate le corrette assegnazioni per *Assay (Saggio)*, *File Name Convention (Convenzione di denominazione dei file)* e *Results Group (Gruppo di risultati)* (vedere rispettivamente la sezione 8.4.5 e 8.4.3).

- 8.5.2.2. Se la mappa della piastra non corrisponde alla configurazione prevista, generare un nuovo file della mappa della piastra ABI a partire dalla sezione 8.5.1.

IMPORTANTE! **NON modificare la mappa della piastra utilizzando ABI Genetic Analyzer. Usare il software per modificare la mappa della piastra; assicurarsi che anche il file LIVS associato sia aggiornato.**

Se la mappa della piastra e i file LIVS sono disallineati, il software NON sarà in grado di eseguire l'analisi dei risultati.

- 8.5.2.3. Selezionare i pozzetti che non contengono una reazione (campione o controllo), *fare clic con il pulsante destro del mouse* e selezionare **delete (elimina)** per impedire la generazione dei risultati.

Nota: il mancato completamento di questo passaggio può causare errori SQ e/o danneggiare il capillare.

- 8.5.2.4. Fare clic su **Save Plate (Salva piastra)**, quindi fare clic su **Link Plate for Run (Collega piastra per la sessione)**.

8.5.3. Analizzare la piastra sullo strumento ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer o ABI 3500xL Genetic Analyzer.

- 8.5.3.1. Caricare la piastra di rilevamento idonea (preparata nella sezione 8.3) sullo strumento ABI secondo le istruzioni del fabbricante.

8.5.3.1.1. Verificare che tutti i pozzetti occupati nella piastra di rilevamento siano privi di bolle d'aria e che il contenuto si trovi sul fondo del pozzetto.

8.5.3.1.2. Verificare che l'orientamento della piastra sia corretto quando viene posizionata nello strumento.

8.5.3.1.3. Verificare che la posizione della piastra sullo strumento ABI sia selezionata correttamente (Piastra A vs Piastra B).

- 8.5.3.2. Fare clic su **Start Run (Avvia sessione)**.

- Lo strumento esegue l'inizializzazione e, se tutti i controlli di qualità interni risultano superati, la sessione ha inizio.

8.5.3.2.1. Assicurarsi che la sessione sia iniziata; verificare che lo sfondo del set di campioni nella prima iniezione sul display della piastra diventi verde.

8.5.4. Preparare i dati della sessione per l'analisi

- 8.5.4.1. Dopo la sessione di ABI, verificare che l'esecuzione sia stata completata senza errori, quindi navigare fino alla posizione del file contenente i risultati dell'esecuzione in formato FSA.

- La posizione del file FSA è determinata da *Results Group (Gruppo di risultati)*, salvato nella sezione 8.4.1, Figura 5.

8.5.4.1.1. Copiare i file FSA nella stessa posizione in cui sono presenti i file LIVS generati dal software.

- La posizione del file LIVS viene specificata durante *Plate Setup (Configurazione della piastra)*; (consultare le IFU del software) al momento del salvataggio della mappa della piastra.

8.5.4.1.2. Procedere all'analisi dei dati utilizzando *IdentiClone Dx IGH Software*; vedere la sezione *Analisi dei risultati* nelle corrispondenti IFU del software.

- 8.5.4.2. Rimuovere la piastra dalla base dello strumento ABI e gettarla.

8.6. Controllo di qualità

I controlli positivi, negativi e senza templatò sono forniti con il kit e devono essere inclusi ogni volta che si esegue il saggio. I dati generati dal saggio vengono interpretati da *IdentiClone Dx IGH Software*, come descritto nella sezione 10.

9. Interpretazione dei risultati

9.1. Punti di controllo del software

IdentiClone Dx IGH Software interpreta i dati generati dallo strumento ABI seguendo una logica prestabilita che richiede punti di controllo della validità per continuare con la fase successiva dell'analisi (Figura 9). Lo stato di clonalità del campione (ossia il risultato *ID campione*) richiede almeno un risultato da una sessione valida per ogni master mix (ossia i risultati *Nome del campione*).



9.1.1. I controlli della sessione vengono valutati per determinare la validità della sessione.

9.1.1.1. Uno stato della sessione valido richiede che i 3 tipi di controlli della sessione (positivo, negativo e senza templat) generino risultati validi; in caso contrario, lo stato della sessione non è valido.

9.1.1.2. Tutti i risultati *Nome del campione* inclusi in una sessione non valida vengono automaticamente considerati non validi e l'analisi si interrompe.

IMPORTANTE! Solo le sessioni valide, che richiedono la validità di tutti e 3 i controlli, passano alla fase successiva.

9.1.2. I risultati *Nome del campione* ottenuti da una sessione valida vengono valutati per la validità (per ogni singola master mix).

9.1.2.1. Un risultato *Nome del campione* non valido non viene sottoposto a ulteriore analisi (ossia lo stato di clonalità della master mix).

9.1.3. I risultati validi *Nome del campione* vengono valutati per la clonalità (per ogni singola master mix).

9.1.3.1. Clonale

9.1.3.2. Non clonale

9.1.3.3. Indeterminato

9.1.4. Per determinare lo stato di clonalità del campione (risultato *ID campione*), vengono valutati i risultati validi *Nome del campione* per tutte e 3 le master mix (Figura 10).

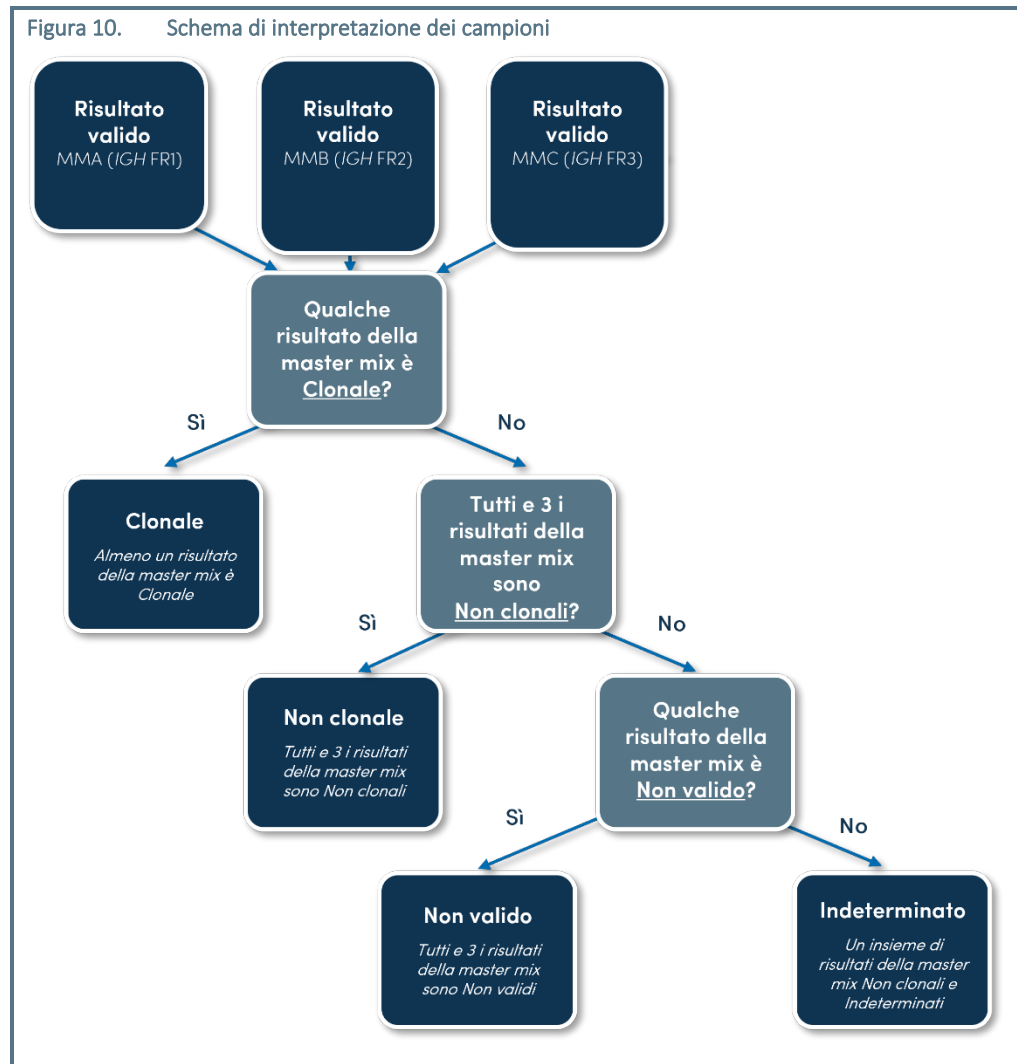
9.1.4.1. Se uno o più risultati del *Nome del campione* (o di campione-master mix) sono clonali, il risultato dell'*ID campione* è **Clonale (Clonale)**.

9.1.4.2. Se tutti i risultati del *Nome del campione* (o di campione-master mix) sono non clonali, il risultato dell'*ID campione* è **Non-Clonale (Non clonale)**.

9.1.4.3. Se i risultati del *Nome del campione* (o di campione-master mix) sono misti di risultati indeterminati e non clonali, il risultato dell'*ID campione* è **Indeterminato (Indeterminato)**.

9.1.4.4. Se un qualsiasi risultato del *Nome del campione* (o di campione-master mix) è non valido e altri risultati sono non clonali o indeterminati, il risultato dell'*ID campione* è **Invalido (Non valido)**.

9.1.4.4.1. Per risolvere lo stato di clonalità dell'*ID campione*, è possibile rianalizzare i risultati non validi del *Nome del campione* (o di campione-master mix) di una sessione valida in base alla sezione 10.



10. Ripetizioni del test, se applicabile

10.1. Sessioni non valide

- 10.1.1. Una sessione nella quale uno dei controlli non soddisfa i criteri di validità viene definita **Invalid Run (Sessione non valida)**. Ripetere la sessione, includendo tutti i campioni, controllo positivo, controllo negativo e NTC. Ogni master mix viene analizzata in modo indipendente.
- 10.1.2. Ripetere la sessione secondo le relative IFU del software, in base ai codici di errore elencati nel report della sessione di IdentiClone Dx IGH Software

10.2. Campioni non validi in una sessione valida

I risultati *Nome del campione* non validi ottenuti da una sessione valida richiedono la ripetizione del test se i risultati *Nome del campione* delle altre master mix riportano Non clonale e/o Indeterminato. In caso contrario, la ripetizione del test non è necessaria. Vedere la Figura 11 per la gerarchia di ripetizione del test.

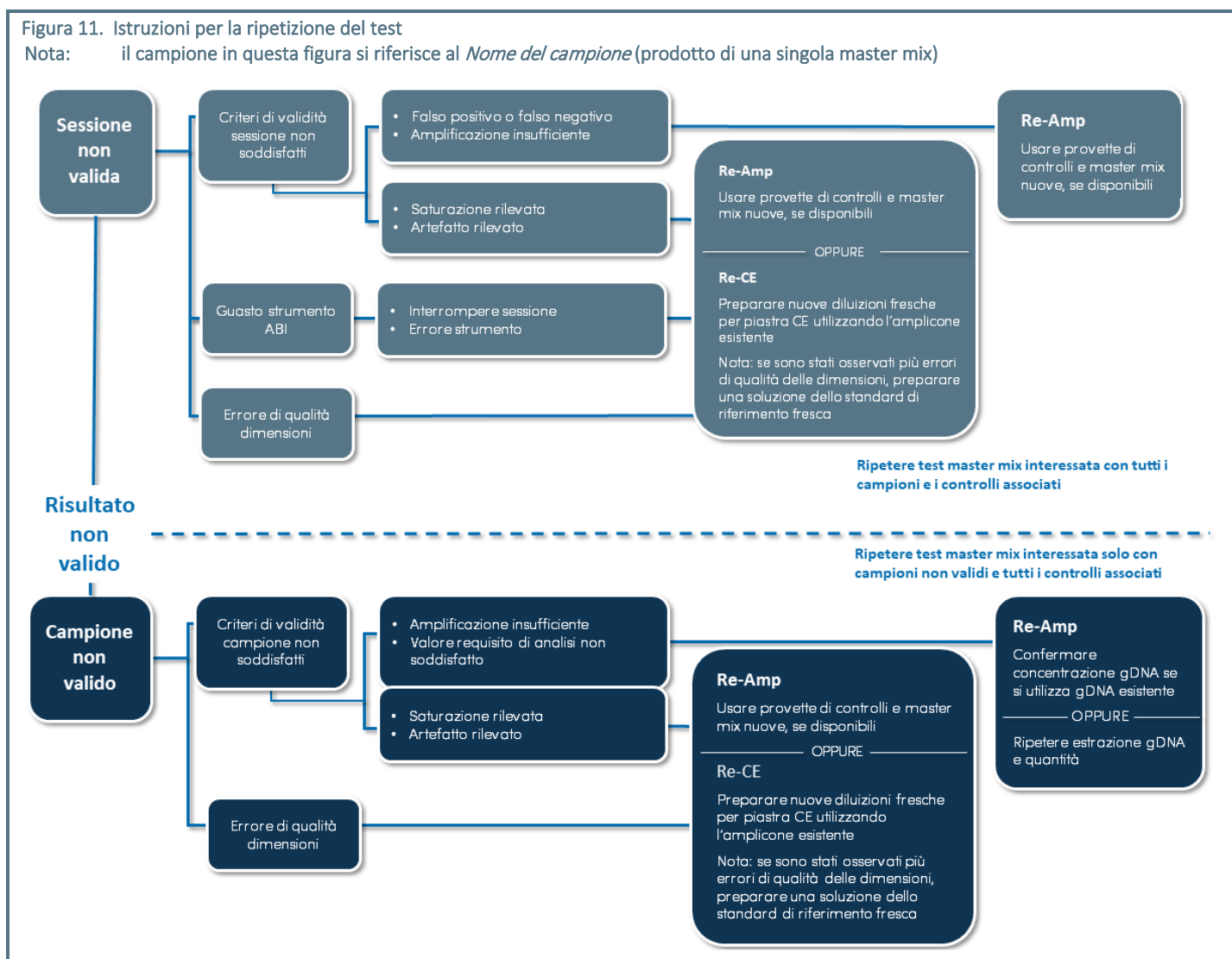
- 10.2.1. Se i risultati di una delle master mix sono **Clonal (Clonali)** (in una sessione valida), non è necessario ripetere il test.
- 10.2.2. Se i risultati di tutte le master mix sono **Non-Clonal (Non clonali)** (nelle sessioni valide), non è necessario ripetere il test.
- 10.2.3. Se i risultati di tutte le master mix sono **Non-Clonal (Non clonali)**, **Indeterminate (Indeterminati)** e **Invalid (Non validi)**, rianalizzare il *Nome del campione* con il risultato non valido e i controlli della sessione associati in base al codice di errore (Figura 11).

10.3. Dettagli di mancata riuscita e ripetizione del test

Sono consentiti fino a quattro eventi di ripetizione del test quando gli errori sono dovuti a una causa diversa (ossia 1° ciclo ⇒ risultato *Nome del campione* Non valido a causa di sessione Non valida; 2° ciclo ⇒ risultati *Nome del campione* Non valido a causa di un artefatto; 3° ciclo ⇒ risultato *Nome del campione* Non valido a causa di saturazione; 4° ciclo ⇒ risultato *Nome del campione* non valido a causa di un errore SQ).

Figura 11. Istruzioni per la ripetizione del test

Nota: il campione in questa figura si riferisce al *Nome del campione* (prodotto di una singola master mix)



11. Limiti della procedura

- Limite di rilevamento: clonalità delle cellule B del 2,5%
- Questo saggio non permette di identificare il 100% delle popolazioni cellulari clonali.
- I risultati dei test molecolari di clonalità devono sempre essere interpretati nel contesto di dati clinici, istologici e immunofenotipici.
- I saggi basati su PCR sono soggetti a interferenze dovute alla degradazione del DNA o all'inibizione della PCR a causa della presenza di EDTA, eparina o altri agenti.

12. Caratteristiche prestazionali

12.1. Convalida dei campioni – Stabilità dei campioni

- 12.1.1. Questo studio fornisce una valutazione della validità del tipo di campione a supporto delle dichiarazioni proposte nelle Istruzioni per l'uso; il dispositivo sperimentale è convalidato per il sangue periferico anticoagulato con EDTA. Lo scopo di questo studio è determinare la stabilità del sangue periferico anticoagulato con EDTA per il tipo di campione per IdentiClone Dx *IGH* Assay, fornendo evidenze oggettive che derivano dall'analisi dei campioni prima e dopo varie condizioni di conservazione con il dispositivo sperimentale rispetto ai risultati dei test basali specifici per il campione. Questo studio è stato condotto su 2 replicati di 15 campioni (10 positivi/clonali con cellule B, 5 non clonali/negativi), analizzati in 5 diversi punti temporali con 1 lotto di reagenti, su più strumenti ABI 3500xL Dx, da più operatori nell'arco di più giorni. I punti temporali analizzati includono:
- Punto temporale-0: basale
 - Punto temporale-1: refrigerati (2-8 °C) per 5 giorni
 - Punto temporale-2: refrigerati (2-8 °C) per 7 giorni
 - Punto temporale-3: temperatura ambiente (15-30 °C) per 5 giorni
 - Punto temporale-4: temperatura ambiente (15-30 °C) per 7 giorni
- 12.1.2. La Tabella 8 fornisce il risultato del test per ogni replicato analizzato dei 15 campioni. Tutti i risultati dei test dei campioni (2 replicati per ciascuno dei 15 campioni) erano validi (tasso di validità del campione del 100,0%, 30/30). Entrambi i replicati di ogni campione non clonale e clonale hanno generato i risultati attesi, il che indica una concordanza del 100,0% tra Punto temporale-0 e Punto temporale-1, Punto temporale-0 e Punto temporale-2, Punto temporale-0 e Punto temporale-3 e Punto temporale-0 e Punto temporale-4.

Tabella 8. Riepilogo dei risultati dello stato di clonalità

ID soggetto	Replicato	Stato di clonalità				
		Punto temporale 0	Punto temporale 1	Punto temporale 2	Punto temporale 3	Punto temporale 4
CS189	1	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale
	2	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale
030723-1	1	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale
	2	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale
030723-2	1	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale
	2	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale
041223-4	1	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale
	2	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale
CS231	1	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale
	2	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale	Non clonale
CS201	1	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
	2	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
DLS08	1	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
	2	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
DLS09	1	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
	2	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
DLS10	1	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
	2	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
DLS11	1	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
	2	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
DLS12	1	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
	2	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
DLS13	1	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
	2	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
DLS14	1	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
	2	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale

Tabella 8. Riepilogo dei risultati dello stato di clonalità

ID soggetto	Replicato	Stato di clonalità				
		Punto temporale 0	Punto temporale 1	Punto temporale 2	Punto temporale 3	Punto temporale 4
DLS15	1	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
	2	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
DLS16	1	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale
	2	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale	Clonale

- 12.1.2.1. I risultati di questo studio dimostrano che il sangue periferico anticoagulato con EDTA mantiene la stabilità per ≥ 5 giorni quando conservato a 2-8 °C o a temperatura ambiente (15-30 °C) per l'uso con IdentiClone Dx IGH Assay.

12.2. Cut-off clinico

- 12.2.1. Questo studio esegue una valutazione comparativa dei dati storici generati da IdentiClone Dx IGH Assay con campioni clinici, precedentemente identificati come positivi per riarrangiamenti clonali del gene IGH, per stabilire il valore di cut-off clinico del rapporto di picco relativo (RPR). I due metodi di riferimento selezionati includono: 1) un saggio IVD disponibile in commercio (al momento dello studio) che applica il sequenziamento di nuova generazione (NGS) per rilevare i riarrangiamenti clonali del gene IGH (saggio di riferimento), con una destinazione d'uso simile al dispositivo sperimentale, IdentiClone Dx IGH Assay e 2) la diagnosi clinica basata sui codici ICD-10 per la patologia linfoproliferativa a cellule B (stato assegnato Clonale) o sana (stato assegnato Non clonale).
- 12.2.2. In totale, sono stati valutati i risultati di 170 campioni. Il primo set di dati includeva 114 campioni che hanno generato un risultato valido sia con il saggio di riferimento (IVD) sia con IdentiClone Dx IGH Assay (IUO); questi sono stati valutati per la concordanza percentuale (%) dei risultati generati dai due saggi. La valutazione è stata eseguita utilizzando 3 diversi valori RPR come cut-off: 2,0, 3,0 e 4,0. Il secondo set di dati includeva 145 campioni che hanno generato un risultato valido con il saggio IdentiClone Dx IGH Assay insieme a una diagnosi clinica nota basata sul codice ICD-10 o sullo stato sano. Questo set di dati è stato valutato per la % di concordanza tra le 2 classificazioni (Clonale o Non clonale) utilizzando un valore di cut-off di 3,0. Per la valutazione sono stati utilizzati diversi sottogruppi di risultati dei test dei 170 campioni perché alcuni campioni hanno generato risultati non validi con IdentiClone Dx IGH Assay (IUO) o il saggio di riferimento (IVD) o perché le informazioni sulla diagnosi clinica (codice ICD-10 o stato sano) non erano disponibili.
- 12.2.2.1. Il primo set di dati di 114 campioni ha confrontato i risultati di clonalità generati da IdentiClone Dx IGH Assay con il saggio di riferimento utilizzando il valore RPR impostato su $\geq 3,0$ come valore di cut-off. I valori OPA, PPA e NPA rispetto al saggio di riferimento erano rispettivamente del 92,1%, 93,8% e 87,9%. Il limite inferiore dell'IC al 95% calcolato utilizzando il metodo del punteggio bilaterale per PPA e NPA era rispettivamente dell'86,4% e del 72,7%. (Tabella 9) Per garantire la robustezza di un valore RPR di cut-off clinico di 3,0, gli stessi dati sono stati rianalizzati utilizzando valori RPR al di sotto e al di sopra di un RPR = 3,0 (ossia RPR = 2,0 e RPR = 4,0). Il valore RPR di cut-off clinico impostato su $\geq 3,0$ si è dimostrato ottimale, in quanto ha generato il miglior valore di concordanza % tra il dispositivo sperimentale e il saggio di riferimento, con un divario più ampio rispetto al valore RPR immediatamente inferiore.

Tabella 9. Valutazione rispetto al saggio di riferimento (IVD)

IdentiClone Dx IGH Assay (IUO)	Saggio di riferimento (IVD)		Totale
	Clonale	Non clonale	
Clonale	76	4	80
Non clonale	5	29	34
Totale	81	33	114
OPA	92,1%		
PPA	93,8% (IC al 95%: 86,4%-97,3%)		
NPA	87,9% (IC al 95%: 72,7%-95,2%)		

- 12.2.2.2. Il secondo set di dati, costituito da 145 campioni, ha confrontato una diagnosi clinica nota (codice ICD-10 o stato sano) con i risultati di clonalità generati con IdentiClone Dx *IGH* Assay utilizzando un valore RPR $\geq 3,0$ come valore di cut-off. I valori OPA, PPA e NPA ottenuti rispetto alla diagnosi clinica erano rispettivamente del 91,7%, 92,8% e 90,3%. Il limite inferiore dell'IC al 95% calcolato utilizzando il metodo del punteggio bilaterale per PPA e NPA era rispettivamente dell'85,1% e dell'80,5%. (Tabella 10)

Tabella 10. Valutazione con diagnosi clinica come metodo di riferimento

IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay (IUO)	Diagnosi clinica (riferimento)		Totale
	Patologia linfoproliferativa a cellule B	Sano	
Clonale	77	6	83
Non clonale	6	56	62
Totale	83	62	145
OPA	91,7%		
PPA	92,8% (IC al 95%: 85,1%-96,6%)		
NPA	90,3% (IC al 95%: 80,5%-95,5%)		

- 12.2.3. I risultati dei test dei campioni clinici generati da IdentiClone Dx *IGH* Assay dimostrano un'elevata concordanza con i metodi di riferimento, utilizzando un valore RPR di cut-off clinico impostato su $\geq 3,0$, che è anche il valore RPR di cut-off per determinare la clonalità. Il limite inferiore dell'IC al 95% per PPA e NPA era superiore al 70% rispetto al saggio di riferimento basato su NGS, a un saggio IVD disponibile in commercio o alla diagnosi clinica.

12.3. Sensibilità analitica: limite del bianco (LoB)

- 12.3.1. Questo studio stabilisce il limite del bianco (LoB) per IdentiClone Dx *IGH* Assay analizzando 20 campioni di donatori non clonali (3 replicati ciascuno) con 2 lotti di reagenti su più ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer, da più operatori nell'arco di più giorni (60 punti dati per ogni master mix e per ogni lotto di reagenti).
- 12.3.2. Tutti (100%) i campioni del pannello di test LoB analizzati erano non clonali (negativi) con RPR $< 3,0$. L'RPR massimo osservato (2,9) è stato generato analizzando un campione clinico negativo con MMA, lotto di reagenti 2. Per ogni lotto di reagenti, 60 risultati del test sono stati classificati in base all'RPR. Il 95° percentile risponde alla 57,5^a classificazione; pertanto, per ogni lotto di reagenti è stata calcolata la media del 57° e 58° RPR per ogni master mix. (Tabella 11) In conclusione, utilizzando l'approccio conservativo, il LoB complessivo del saggio è definito come RPR di 2,0.

Tabella 11. Riepilogo dei risultati LoB

Lotto di reagenti	MM	Classificazione	RPR	RPR medio delle classificazioni 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. Sensibilità analitica: limite di rilevamento (LoD)

- 12.4.1. Questo studio stabilisce un limite di rilevamento (LoD) per IdentiClone Dx *IGH* Assay fornendo evidenze oggettive dai risultati generati con il gDNA clinico estratto da sangue periferico che rappresenta i clan di *IGH* (I, II e III) diluiti con gDNA da sangue periferico raggruppato (PPB) in pool ottenuto da donatori sani.
- 12.4.2. Un totale di 20 campioni (10 donatori sani e 10 donatori con sospetta linfoproliferazione di cellule B con stato non clonale) comprendeva il PPB utilizzato per preparare le 7 diluizioni di gDNA che rappresentano ogni clan di *IGH* (I/II/III) utilizzato per l'analisi con il dispositivo sperimentale: 0,0%, 0,3%, 1,0%, 3,0% e 10,0%. I valori RPR ottenuti dai campioni che hanno generato un risultato clonale sono stati verificati rispetto alla tabella degli standard di clonalità (Tabella 12), che fornisce la correlazione tra il valore RPR generato per ogni master mix con ogni clan di *IGH* e la % di diluizione del riarrangiamento clonale di *IGH*. Un minimo di 20 risultati validi sono stati generati con IdentiClone Dx *IGH* Assay per ogni clan di *IGH* a ogni diluizione, con ciascun lotto di reagenti. Questo studio è stato condotto con 2 lotti di reagenti, su più strumenti ABI3500xL Dx, da più operatori nell'arco di più giorni.

Tabella 12. Tabella degli standard di clonalità

Diluizione % o clonalità %	Valori RPR della master mix							
	<i>IGH</i> , clan I ^A			<i>IGH</i> , clan II ^B		<i>IGH</i> , clan III ^C		
	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

^ALinea cellulare IVS-0019 utilizzata come standard clonale per la stima della clonalità del clan I di *IGH*

^BLinea cellulare IVS-0002 utilizzata come standard clonale per la stima della clonalità del clan II di *IGH*

^CLinea cellulare IVS-0003 utilizzata come standard clonale per la stima della clonalità del clan III di *IGH*

- 12.4.2.1. La diluizione 1,0% del clan I di *IGH* amplificata con la master mix C (lotto di reagenti 1 - 95% positivo, RPR medio = 4,1) e la diluizione 3,0% del clan 1 di *IGH* con MMA, MMB e MMC (MMA del lotto di reagenti 2 - 100% positiva, RPR medio = 9,9; MMB del lotto di reagenti 2 - 100% positiva, RPR medio = 12,8; MMC del lotto di reagenti 2 - 100% positiva, RPR medio = 13,2) sono la diluizione % più bassa con la % positiva pari a $\geq 95\%$ per ogni lotto di reagenti della master mix. (Tabella 13 e Tabella 14). Poiché il LoD deve essere stabilito in base alle prestazioni peggiori, per la valutazione è stato selezionato il risultato di diluizione % più elevato dei due lotti di reagenti (valori RPR generati dalla diluizione al 3,0% del clan I di *IGH* con il lotto di reagenti 2). I valori di RPR generati dalla diluizione del clan I di *IGH* al 3,0% con ogni master mix sono stati valutati rispetto alla tabella degli standard clonali e per convertire la diluizione % in clonalità %.
- 12.4.2.1.1. In base alla tabella degli standard clonali, i valori RPR di MMA, MMB e MMC rientrano nell'intervallo corrispondente all'intervallo di clonalità dell'1,0%-2,5% per MMA (intervallo RPR = 5,1-14,9), all'intervallo di clonalità dell'1%-2,5% per MMB (intervallo RPR = 10,8-26,7) e all'intervallo di clonalità dello 0,5%-1% per MMC (intervallo di valori RPR = 5,9-13,3). Utilizzando un approccio conservativo, il LoD per il clan I di *IGH* è definito come clonalità del 2,5%.
- 12.4.2.2. La diluizione al 3,0% del clan 2 di *IGH* amplificata con MMB è la diluizione % più bassa in cui è stata osservata una % positiva $\geq 95\%$ (lotto reagente - 100% positivo, RPR medio = 8,5; lotto reagente 2 - 100% positivo, RPR medio = 8,3). I valori RPR di 8,5 e 8,3 per MMB sono correlati a una clonalità dell'1,0%-2,5%, secondo la tabella degli standard clonali. Pertanto, il LoD per il clan 2 di *IGH* è definito come clonalità del 2,5%.
- 12.4.2.3. La % di diluizione più bassa in cui la % positiva di $\geq 95\%$ osservata per il clan III di *IGH* è la diluizione dell'1,0% con MMC (100% positivo, RPR medio = 6,3) con entrambi i lotti di reagenti. Utilizzando la tabella degli standard di clonalità, un RPR di 6,3 rientra in un intervallo di valori RPR che corrispondono a un intervallo di clonalità di 0,5%-1,0%. Pertanto, il LoD per il clan III di *IGH* è definito come clonalità dell'1,0%.

- 12.4.3. Poiché il LoD per clan I, II e III di *IGH* è stato definito come clonalità del 2,5%, 2,5% e 1% e applicando un approccio conservativo, il LoD complessivo del saggio è definito come 2,5%.

Tabella 13. Riepilogo dei risultati del LoD per il lotto di reagenti 1

Clan	% di diluizione	MMA			MMB			MMC		
		N. validi	% pos	RPR medio	N. validi	% pos	RPR medio	N. validi	% pos	RPR medio
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

Tabella 14. Riepilogo dei risultati del LoD per il lotto di reagenti 2

Clan di <i>IGH</i>	% di diluizione	MMA				MMB				MMC			
		N. validi	N. clonali	% pos	RPR medio	N. validi	N. clonali	% pos	RPR medio	N. validi	N. clonali	% pos	RPR medio
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
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. Specificità analitica: sostanze interferenti

- 12.5.1. Il disegno di questo studio si basa sugli standard CLSI EP07-A3 ed EP37-Ed1 e include la valutazione dell'effetto di 6 diverse sostanze potenzialmente interferenti, quando presenti nel campione analizzato con IdentiClone Dx IGH Assay. Le sostanze analizzate erano bilirubina, emoglobina, colesterolo, EDTA, trigliceridi ed etanolo al 70%, inoculato nei campioni di gDNA dopo l'estrazione, poiché la potenziale introduzione di questa sostanza nel flusso di lavoro del saggio si verificava dopo l'estrazione del gDNA. Le altre sostanze sono state invece inoculate in campioni di sangue periferico fresco prima dell'estrazione del gDNA.
- 12.5.2. In totale, in questo studio sono stati utilizzati 24 campioni di sangue periferico fresco (mai congelati) anticoagulati in campioni EDTA prelevati da donatori normali (negativi/non clonali) o da donatori con diagnosi di linfoproliferazione di cellule B (positivi/clonali) e conservati a una temperatura di 2-8 °C fino a 7 giorni prima dell'estrazione del gDNA. Ogni campione è stato analizzato in duplicato, non inoculato o inoculato, compresi 10 campioni clonali per ciascuna sostanza e 5 campioni non clonali per ciascuna sostanza. Questo studio è stato condotto con 2 lotti di reagenti, su più strumenti ABI3500xL Dx, da più operatori nell'arco di più giorni.
- 12.5.3. I risultati di questo studio sono riportati nella Tabella 15 e non mostrano alcuna interferenza da parte delle 6 sostanze alle concentrazioni analizzate. Tutti i campioni hanno generato lo stato di clonalità previsto (clonale o non clonale) quando sono stati analizzati non inoculati rispetto a quelli inoculati. Nello specifico, ogni sostanza interferente ha analizzato 5 campioni non clonali e 10 clonali, ad eccezione del colesterolo. Il colesterolo è stato analizzato con 5 campioni non clonali e 11 clonali e ogni campione non inoculato e inoculato è stato analizzato in duplicato. Complessivamente, sono stati definiti 30 risultati di clonalità per ogni sostanza interferente prima e dopo l'inoculazione, ad eccezione del colesterolo (32 identificazioni finali). Tutti i risultati dello stato di clonalità generati dai campioni inoculati erano concordanti con i risultati dello stato di clonalità generati dai campioni corrispondenti non inoculati, a dimostrazione del fatto che le sostanze analizzate non interferivano con il saggio alla concentrazione analizzata. Il limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% per la % di concordanza per ogni sostanza interferente era pari o superiore all'88,4%. (Tabella 15)

Tabella 15. Percentuale di concordanza finale delle identificazioni sostanza non inocolata vs. interferente

Sostanza interferente (concentrazione finale del test)	Tipo di campione	N.	Risultati totali del test		Risultato totale concordante ²	% di concordanza (IC al 95%) ³
			Non inoculato	Inoculato		
Colesterolo (4,0 mg/ml)	Non clonale	5	32	32	32	100,0%
	Clonale	11				(89,1-100,0)
Trigliceridi (15,0 mg/ml)	Non clonale	5	30	30	30	100,0%
	Clonale	10				(88,4-100,0)
Emoglobina (100 mg/ml)	Non clonale	5	30	30	30	100,0%
	Clonale	10				(88,4-100,0)
Bilirubina (0,4 mg/ml)	Non clonale	5	30	30	30	100,0%
	Clonale	10				(88,4-100,0)
EDTA (5,4 mg/ml)	Non clonale	5	30	30	30	100,0%
	Clonale	10				(88,4-100,0)
Etanolo al 70% (10% v/v)	Non clonale	5	30	30	30	100,0%
	Clonale	10				(88,4-100,0)

¹Due replicati per ogni campione analizzato prima e dopo l'inoculazione di sostanze interferenti.

²Risultati dei test inoculati che coincidono con il corrispondente risultato del test non inoculato ottenuto dagli stessi campioni.

³Metodo esatto di Clopper-Pearson.

12.6. Specificità analitica: carry-over / contaminazione crociata

- 12.6.1. Questo studio ha valutato il tasso di carry-over e contaminazione crociata durante il flusso di lavoro di IdentiClone Dx *IGH* Assay durante la preparazione della PCR e durante l'analisi dei frammenti tramite elettroforesi capillare. I test sono stati condotti su 106 campioni negativi artificiali per il carry-over e su 126 campioni negativi artificiali per la contaminazione crociata. I campioni artificiali negativi (non clonali) sono stati preparati con DNA di controllo policlonale IVS-0000 al 100%; i campioni artificiali positivi (clonali) sono stati preparati con DNA di controllo clonale IVS-0019 al 100%.
- 12.6.2. La disposizione della piastra è costituita da campioni positivi e negativi alternati in uno schema a scacchiera, progettato per massimizzare l'occorrenza di carry-over e contaminazione crociata. Questi campioni sono stati amplificati con la master mix A (MMA), scelta come master mix rappresentativa, poiché la contaminazione dipende dal segnale dell'amplicone e non dalla master mix. I test sono stati condotti su più piastre con disposizioni di campioni alternati su 2 diversi ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer da 1 operatore, con 1 lotto di reagenti, in più giorni.
- 12.6.3. Prima di eseguire la frammentazione tramite elettroforesi capillare sui campioni di test, è stata stabilita una linea di base analizzando una piastra costituita da una soluzione Liz/HIDI mediante lo strumento, per confermare l'assenza di qualsiasi segnale contaminante presente da studi precedenti. Il residuo è stato valutato utilizzando i dati generati da campioni negativi provenienti da piastre costituite dalla stessa disposizione dei campioni (10 iniezioni totali, 106 campioni negativi combinati). Tutti i 105 risultati negativi dei campioni qualificati per la valutazione del carry-over hanno generato risultati non clonali. La percentuale di false identificazioni attribuibili al carry-over è dello 0,0% (0/105), con un limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% pari al 96,5%. La contaminazione crociata è stata valutata utilizzando i dati generati da campioni negativi provenienti da piastre contenenti una disposizione di campioni alternati (rispetto a quelli valutati per il carry-over); 12 iniezioni totali, 126 campioni negativi combinati; la percentuale di false identificazioni attribuibili a contaminazione crociata è dello 0,0% (0/125), con un limite inferiore dell'IC al 95% pari al 97,1%. Dei 129 risultati positivi dei campioni, tutti erano clonali tranne 2 risultati indeterminati, che hanno entrambi generato picchi di RFU elevate rispetto ad altri campioni positivi e sono stati definiti come segnali validi e potenzialmente contaminanti. I risultati positivi dei campioni analizzati su due strumenti hanno mostrato un valore medio di RPR pari a 100,4. Il valore medio di RPR dei risultati negativi dei campioni analizzati su due strumenti qualificati per la valutazione del carry-over e della contaminazione crociata è risultato pari a 1,2 in entrambi i casi. (Tabella 16)

Tabella 16. Valori RPR medi con strumento ABI

Tipo	Strumento ABI	N.	RPR medio	CV %
Clonale	1	65	97,8	30,2
	2	62	103,2	36,3
	Combinato	127	100,4	33,5
Carry-over (Non clonale)	1	63	1,2	4,3
	2	62	1,2	5,0
	Combinato	125	1,2	4,6
Contaminazione crociata (Non clonale)	1	53	1,2	4,3
	2	52	1,2	4,8
	Combinato	105	1,2	4,6

12.7. Specificità analitica: studio di precisione intra-laboratorio

- 12.7.1. La precisione di IdentiClone Dx *IGH* Assay è stata determinata analizzando lo stesso pannello di campioni da 3 operatori su 3 strumenti e utilizzando 3 lotti di reagenti nell'arco di 20 giorni. Il pannello dei campioni era costituito da 1 campione negativo di gDNA, preparato da un gruppo di campioni clinici negativi e 6 campioni positivi, preparati da un campione clinico positivo di gDNA miscelato con un campione clinico negativo di gDNA raggruppato in pool, a un LoD 1,5X e a un LoD 3X. Ogni campione nel pannello è stato analizzato in triplicato e il test è stato condotto ad almeno 20 giorni di distanza.
- 12.7.2. Tutti i risultati dei test dei pannelli corrispondevano al risultato di clonalità atteso (100,0%). Il campione negativo ha generato risultati non clonali in tutti i replicati (100,0%). I campioni a bassa positività (LoD 1,5X) hanno generato risultati clonali in tutti i replicati (100,0%), così come i campioni ad alta positività, che hanno prodotto risultati clonali in tutti i replicati (100,0%). Il CV % del valore RPR prodotto da ogni master mix è riportato nella Tabella 17, mentre il CV % del valore RPR generato dai campioni a bassa positività con le master mix clonali è mostrato di seguito.
- 12.7.2.1. Valore RPR per MMA: il CV % osservato era del 12,2%
- 12.7.2.2. Valore RPR per MMB: il CV % osservato era del 10,5%
- 12.7.2.3. Valore RPR per MMC: il CV % osservato era dell'8,5%

- 12.7.3. La variazione totale, tra operatore, strumenti, lotti di reagenti e la variazione intra-sessione sono riportate nella Tabella 17.
- 12.7.3.1. I risultati del fattore lotto hanno prodotto la variabilità massima intra-sessione per tutti i campioni (variabilità media = 7,9%; minimo = 0% e massimo = 42,3%).
- 12.7.3.2. I risultati del fattore operatore hanno generato una media del 3,1% (minimo = 0% e massimo = 21,7%).
- 12.7.3.3. La varianza % attribuita allo strumento ABI aveva una varianza media del 2,2% (minimo = 0% e massimo = 8,5%).
- 12.7.3.4. I risultati del fattore intrinseco sono stati attribuiti a una varianza media dell'86,9% (minimo = 55,4% e massimo = 99,9%).
- 12.7.4. Nel complesso, tutti i risultati dei test dei campioni corrispondevano al risultato di clonalità atteso (100,0%). Il CV % del valore RPR era ≤ 25 per i campioni a bassa positività con MMA, MMB e MMC, rispettivamente, con 3 operatori, 3 strumenti e 3 lotti di reagenti.

Tabella 17. Variabilità della precisione del saggio (intra-laboratorio)

PM	MM	N. valido	RPR medio	Tipo di variazione				Variazione totale	
				Tra operatori	Tra strumenti	Tra lotti di reagenti	Intra-sessione	DS	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. Precisione della misurazione: studio di riproducibilità multi-centrico

- 12.8.1. Lo scopo di questo studio era determinare se IdentiClone Dx *IGH* Assay funzionasse come previsto quando analizzato in 3 centri diversi. I test sono stati condotti su un pannello contenente 6 campioni positivi (3 a bassa positività e 3 a media positività) e un campione negativo con il dispositivo sperimentale in triplicato, utilizzando 1 lotto di reagenti, da 2 operatori in 3 diversi centri di analisi, in 5 diverse sessioni di test. Il membro negativo del pannello è stato preparato da un pool di campioni clinici di gDNA precedentemente determinati come non clonali per *IGH* e i componenti positivi del pannello erano costituiti da campioni clinici di gDNA (precedentemente determinati come clonali per *IGH*), miscelati con campioni clinici negativi di gDNA a LoD 1,5X (bassa positività) e LoD 3X (media positività).

- 12.8.2. Il membro negativo del pannello ha generato risultati non clonali in tutti e tre i centri e in tutte le sessioni valide (100,0%, 88/88). I membri del pannello a bassa e media positività hanno generato risultati clonali in tutti e tre i centri e in tutte le sessioni valide (rispettivamente 100,0%, 90/90 e 100,0%, 90/90). La variazione totale dei valori RPR dovuti a centro, operatore, sessione, intra-sessione e il CV % del valore RPR per ogni membro del pannello è mostrata nella Tabella 18 (master mix dominante con RPR più alto solo per PM positivi, tutte e tre le master mix per PM negativo).
- 12.8.3. Nel complesso, la varianza % attribuita al centro presentava una media del 15,4% e un intervallo di 0,0%-50,9%.
- 12.8.3.1. La varianza % attribuita all'operatore presentava una media dello 0,5% e un intervallo di 0,0%-4,3%.
- 12.8.3.2. La varianza % attribuita alle sessioni di test presentava una media del 9,9% e un intervallo di 0,0%-20,8%.
- 12.8.3.3. La varianza % attribuita al fattore intra-sessione presentava un valore medio del 75,5% e un intervallo compreso tra il 31,7% e il 100,0%.

Tabella 18. Variabilità di precisione tra centri di IdentiClone Dx IGH Assay in base al valore RPR

Tipo di controllo	MM	N.	Statistiche di riepilogo			Tipo di variazione				Variazione totale	
			Min	Media	Max	Tra centri	Tra operatori	Tra sessioni ¹	Intra-sessione	DS	CV %
Bassa positività	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
Media positività	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

¹Sessioni di test; per ogni centro ne sono state eseguite 5.

12.9. Convalida del flusso di lavoro del saggio – studio sull'estrazione del DNA

- 12.9.1. Questo studio dimostra in modo oggettivo che tre comuni metodi commerciali di estrazione del DNA genomico (gDNA) producono una quantità di gDNA sufficiente per l'impiego con IdentiClone Dx IGH Assay. Sono stati valutati tre (3) diversi metodi di estrazione disponibili in commercio: 1) isolamento su colonna di silice, 2) estrazione magnetica automatizzata basata su microsfere (King Fisher Flex) e 3) precipitazione. Tali metodi sono stati utilizzati per estrarre il gDNA da campioni di sangue periferico in EDTA provenienti da 2 donatori con diagnosi linfoproliferativa (clonale) delle cellule B e da 8 donatori sani (non clonale). Nella Tabella 19 sono riportati i kit in base al fornitore e al metodo di estrazione.

Tabella 19. Kit di estrazione in base al metodo di estrazione

Metodo	Nome del kit	Fornitore	Metodo di estrazione
1	QIAamp DNA Blood Mini kit (QIA)	QIAGEN	Membrana di silice
2	Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PWIZ)	Promega	Precipitazione
3	Kit MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 (KFF)	Thermo Fisher Scientific	Microsfere magnetiche

- 12.9.2. I campioni sono stati estratti seguendo le istruzioni associate del fabbricante e il gDNA ottenuto è stato quantificato utilizzando uno spettrofotometro UV-VIS e NanoDrop 2000. Dopo la quantificazione, il gDNA (1 replicato per ciascun metodo di estrazione) è stato analizzato con IdentiClone Dx IGH Assay; il completamento dell'analisi dei dati si è verificato entro 48 ore dall'estrazione.
- 12.9.3. È stato dimostrato che tutti e tre i metodi di estrazione generano la quantità di gDNA necessaria per il saggio, con ciascun campione che ha generato ≥ 250 ng di gDNA indipendentemente dal metodo di estrazione utilizzato. La quantità totale di gDNA è stata calcolata dalla media di 3 replicati delle letture Nanodrop per ciascuno dei 10 campioni, per ogni metodo di estrazione. (Tabella 20) Sono stati utilizzati volumi diversi per soddisfare i requisiti per ogni kit di estrazione:

- 12.9.3.1. Il kit PWIZ richiedeva 300 µl di sangue periferico e il gDNA è stato eluito in 100 µl, il che ha generato un intervallo di 6.846,7 ng – 26.336,7 ng di gDNA totale
- 12.9.3.2. Il kit QIA richiedeva 200 µl di sangue periferico e il gDNA è stato eluito in 50 µl, il che ha generato un intervallo di 2.656,7 ng – 10.963,3 ng di gDNA totale
- 12.9.3.3. Il kit KFF richiedeva 300 µl di sangue periferico e il gDNA è stato eluito in 50 µl, il che ha generato un intervallo di 6.795,0 ng – 33.338,3 ng di gDNA totale

Tabella 20. Riepilogo degli estratti totali di gDNA

N. campione	QIA gDNA totale (ng)	Concentrazione media di gDNA in QIA (ng/µl)	PWIZ gDNA totale (ng)	gDNA medio in PWIZ Concentrazione (ng/µl)	KFF gDNA totale (ng)	gDNA medio in KFF Concentrazione (ng/µl)
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. Tutti e 30 i replicati (10 campioni analizzati con 3 metodi di estrazione) hanno generato almeno 250 ng di gDNA (30/30, con un limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% ≥80%). Il gDNA totale recuperato dai metodi PWIZ e KFF era simile, in quanto è stato utilizzato lo stesso volume di input di sangue periferico (300 µl) per ciascuna estrazione, rispetto a QIA, che utilizzava un volume di input di sangue periferico inferiore (200 µl). Quando è stato analizzato con IdentiClone Dx *IGH* Assay, il gDNA estratto ha mostrato valori RPR simili (CV % compreso tra 1% e 21%) e risultati concordanti della master mix in tutti e tre i metodi di estrazione. (Tabella 21) La processazione dei campioni (compresa l'estrazione del DNA) fino al risultato (inclusa l'analisi dei dati) ha richiesto 28 ore o meno per tutti i campioni.

Tabella 21. Riepilogo dei risultati di IdentiClone Dx *IGH* Assay ottenuti dai 3 metodi di estrazione

Campione	MM o totale	RPR di QIA	RPR di PWIZ	RPR di 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%
	Totale	Non clonale	Non clonale	Non clonale	N/A
PM2	A	Errore SQ*	1,4	1,3	4%
	B	1,3	1,3	1,5	7%
	C	1,8	1,1	1,4	20%
	Totale	N/A	Non clonale	Non clonale	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%
	Totale	Non clonale	Non clonale	Non clonale	N/A
PM4	A	Non valido	1,2	1,4	8%
	B	1,8	1,4	1,4	12%
	C	1,2	1,4	1,3	6%
	Totale	N/A	Non clonale	Non clonale	N/A

Tabella 21. Riepilogo dei risultati di IdentiClone Dx *IGH* Assay ottenuti dai 3 metodi di estrazione

Campione	MM o totale	RPR di QIA	RPR di PWIZ	RPR di KFF	CV %
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%
	Totale	Non clonale	Non clonale	Non clonale	N/A
PM6	A	1,6	1,2	1,2	14%
	B	1,2	1,5	Non valido	11%
	C	1,4	1,6	1,6	6%
	Totale	Non clonale	Non clonale	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%
	Totale	Non clonale	Non clonale	Non clonale	N/A
PM8	A	1,3	1,2	Non valido	4%
	B	1,5	1,7	1,5	6%
	C	1,3	1,3	1,6	10%
	Totale	Non clonale	Non clonale	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%
	Totale	Clonale	Clonale	Clonale	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%
	Totale	Clonale	Clonale	Clonale	N/A

*Non è stato effettuato un altro test.

N/A = Non applicabile

12.10. Convalida del flusso di lavoro del saggio – studio sull'input del DNA

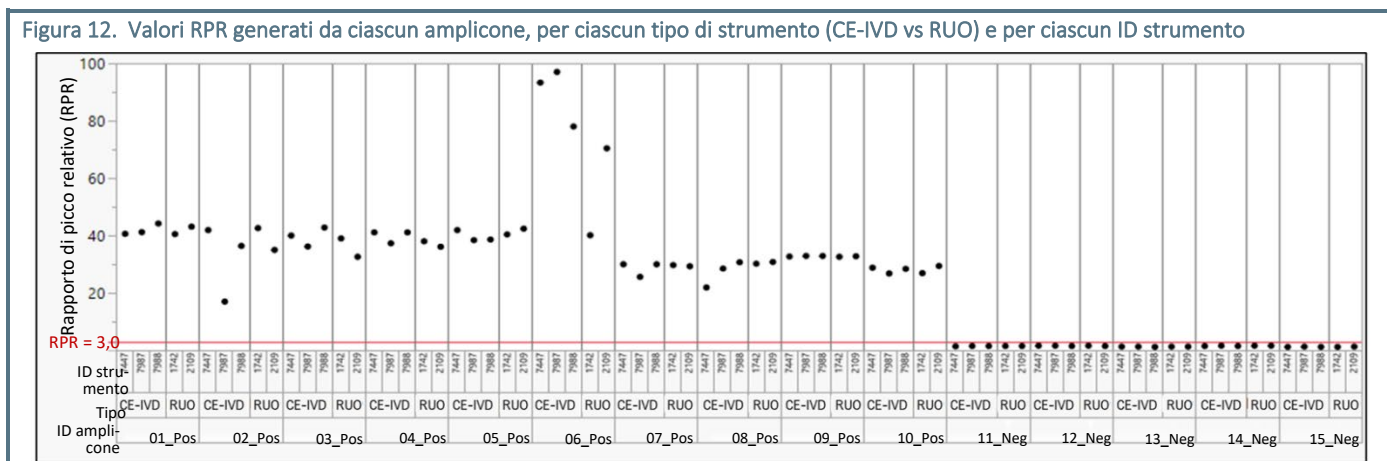
- 12.10.1. Lo scopo di questo studio è fornire evidenze oggettive dei requisiti di input del gDNA per IdentiClone Dx *IGH* Assay. La valutazione di 5 diverse quantità di input di gDNA (500 ng, 250 ng, 200 ng, 125 ng e 25 ng) è stata eseguita su 10 campioni clinici (5 con una diagnosi clinica positiva e 5 con una diagnosi clinica negativa di linfoproliferazione di cellule B) utilizzando IdentiClone Dx *IGH* Assay. La concentrazione di tutti i campioni di gDNA è stata misurata utilizzando lo stesso spettrofotometro Nanodrop 2000. I test sono stati eseguiti in duplicato su 6 sessioni, su 1 strumento ABI 3500xL Dx, da 1 operatore utilizzando 1 lotto di reagenti, in più giorni.
- 12.10.2. Dei 100 possibili risultati dello stato di clonalità (10 campioni analizzati in duplicato per 5 diverse condizioni di input), sono stati ottenuti 96 risultati complessivi (utilizzando tutte e 3 le master mix). I 4 campioni che non hanno generato risultati complessivi contenevano il livello di input di DNA più basso (25 ng), in cui i replicati presentavano risultati non validi a causa dell'amplificazione bassa in una o più master mix. La causa probabile di questi risultati non validi è un input di DNA insufficiente; pertanto, questi risultati non sono stati rianalizzati. Dei 96 risultati complessivi generati, 95 sono risultati concordanti con i risultati attesi; la concordanza complessiva è del 99,0%. Nella Tabella 22 è riportata la concordanza dei risultati dello stato di clonalità per ciascun membro del pannello e livello di input di DNA. Il risultato discordante si è verificato in PM09, che conteneva il livello di input di DNA più basso (25 ng); un replicato di questo membro del pannello non clonale previsto ha generato un risultato "clonale" con la master mix B, generando un valore RPR di 3,2, superiore al cut-off del saggio di 3,0. Questo risultato discordante era potenzialmente attribuibile al basso input di DNA, che potrebbe aver ridotto le RFU del picco di fondo (denominatore per il calcolo RPR) al di sotto delle RFU del picco massimo (numeratore per il calcolo RPR), aumentando artificialmente l'RPR fino a superare leggermente il valore di cut-off pari a 3,0. Dei 20 risultati dello stato di clonalità generati con l'input di DNA previsto (250 ng), tutti erano concordanti con i risultati attesi. La concordanza complessiva dei risultati per il livello di input del DNA previsto è del 100,0%.

Tabella 22. Concordanza complessiva dei risultati

Membro del pannello	Clonalità attesa	Concordanza complessiva dei risultati				
		500 ng	250 ng (prevista)	200 ng	125 ng	25 ng
PM01	Clonale	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)
PM02	Clonale	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)
PM03	Clonale	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)
PM04	Clonale	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)
PM05	Clonale	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)
PM06	Non clonale	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	N/A
PM07	Non clonale	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	N/A
PM08	Non clonale	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)
PM09	Non clonale	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	50% (1/2)
PM10	Non clonale	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)
Totale		100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	93,8% (15/16)

12.11. Convalida del flusso di lavoro del saggio – Equivalenza: 3500xL vs 3500xL Dx

- 12.11.1. Questo studio dimostra che i risultati di IdentiClone Dx *IGH* Assay sono equivalenti, se vengono ottenuti utilizzando due versioni diverse di uno strumento simile:
 - 12.11.1.1. 3500xL Genetic Analyzer di Applied Biosystems (RUO) e
 - 12.11.1.2. 3500xL Dx Genetic Analyzer di Applied Biosystems (CE-IVD)
- 12.11.2. I campioni, comprendenti 15 ampliconi derivati da 10 campioni clonali e 5 campioni non clonali (oltre agli ampliconi dei controlli di sessione associati), sono stati analizzati con IdentiClone Dx *IGH* Assay su cinque strumenti ABI 3500 diversi (2 RUO e 3 CE-IVD).
- 12.11.3. Dai cinque strumenti sono stati generati un totale di 75 risultati validi (15 ampliconi x 1 replicato x 5 strumenti). Questi risultati sono stati ulteriormente valutati per calcolare i valori del rapporto di picco relativo (RPR), i risultati dello stato di clonalità, l’RPR medio in base al tipo di strumento e la differenza RPR media tra i tipi di strumento. (Figura 12)
- 12.11.4. I risultati dei test generati con i 15 ampliconi (10 clonali/positivi e 5 non clonali/negativi) erano concordanti al 100% con i risultati attesi su tutti e cinque gli strumenti. I valori RPR generati dagli ampliconi positivi variavano da 17,0 a 97,0 e i valori RPR generati dagli ampliconi negativi variavano da 1,2 a 1,6. Una differenza massima del 61,9% è stata calcolata dai valori medi di RPR generati dai diversi strumenti; tuttavia, ciò può essere attribuito a un risultato del test RUO “anomalo”, che ha generato un valore RPR significativamente inferiore rispetto ai risultati degli altri quattro strumenti (40,1, rispetto a 70,4, 78,0, 93,3, 97,0 e 78,0, rispettivamente). Poiché questo amplicone è altamente positivo (alta clonalità %), è improbabile che causi una differenza nel risultato dello stato clonale quando viene analizzato su un tipo di strumento rispetto all’altro. La differenza percentuale più alta osservata per gli ampliconi positivi e negativi rimanenti era rispettivamente del 18,1% e del 4,2%. Nel complesso, i risultati concordanti del 100,0% ottenuti dai cinque strumenti dimostrano che le prestazioni di IdentiClone Dx *IGH* Assay su ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer e ABI 3500xL Genetic Analyzer sono equivalenti.



12.12. Convalida clinica

12.12.1. Panoramica dello studio cardine sull'accuratezza clinica

- 12.12.1.1. Questo studio cardine sull'accuratezza è stato progettato per valutare l'equivalenza delle prestazioni cliniche tra IdentiClone Dx *IGH* Assay (il dispositivo sperimentale) e un dispositivo di riferimento su DNA retrospettivo e residuo de-identificato estratto da campioni di sangue periferico (PB) provenienti da soggetti con sospetta linfoproliferazione di cellule B. Il dispositivo di riferimento è un saggio IVD disponibile in commercio (al momento dello studio) che applica l'NGS per rilevare riarrangiamenti clonali del gene *IGH* (saggio di riferimento), con una destinazione d'uso simile al dispositivo sperimentale, IdentiClone Dx *IGH* Assay, sullo stesso tipo di campione.
- 12.12.1.2. IdentiClone Dx *IGH* Assay è stato sviluppato da Invivoscribe come dispositivo diagnostico *in vitro* destinato al rilevamento qualitativo mediante elettroforesi capillare di riarrangiamenti clonali del gene della catena pesante delle immunoglobuline (*IGH*) nel DNA genomico estratto dal sangue periferico di pazienti con sospette linfoproliferazioni. Il saggio di riferimento utilizza la tecnologia NGS per identificare i riarrangiamenti clonali di *IGH* V_H-J_H, le sequenze di DNA associate delle regioni V_H-J_H e la distribuzione della frequenza di utilizzo dei segmenti della regione V_H e J_H.

12.12.2. Obiettivi dello studio

- 12.12.2.1. Gli obiettivi di questo studio cardine sull'accuratezza erano: 1) stabilire la concordanza tra i risultati di IdentiClone Dx *IGH* Assay e del saggio di riferimento valutando la percentuale di concordanza positiva e negativa tra i due saggi e 2) stimare la relazione tra le diagnosi della malattia e il rilevamento della clonalità.

12.12.3. Popolazione di pazienti

- 12.12.3.1. Nello studio sono stati arruolati 303 campioni in totale; tuttavia, 54 campioni non sono risultati idonei al confronto tra il saggio di riferimento e il dispositivo sperimentale (IdentiClone Dx *IGH* Assay). Di questi, 4 campioni non sono stati spediti al centro di analisi e 50 campioni sono stati classificati come Quantità non sufficiente (QNS, Quantity Not Sufficient) o non valutabili con almeno un saggio; ciò li ha resi non idonei all'inclusione nell'analisi comparativa. I restanti 249 campioni erano costituiti da due popolazioni di analisi: 1) un set di analisi *con* soggetti sani (n=249), che includeva DNA da sangue periferico di soggetti con sospetta patologia linfoproliferativa con risultati negativi di clonalità delle cellule B o DNA estratto da campioni di sangue periferico sani e normali e 2) un set di analisi *senza* soggetti sani (n=203), che includeva campioni di DNA provenienti da pazienti con diagnosi di patologia linfoproliferativa a cellule B.
- 12.12.3.1.1. Tutti i soggetti (campioni) arruolati nello studio sono stati inclusi nel set di arruolamento (ES, Enrollment Set). L'analisi della concordanza tra IdentiClone Dx *IGH* Assay e il saggio di riferimento ha utilizzato la popolazione ES.
- 12.12.3.1.2. Il set di analisi primario (PAS, Primary Analysis Set) include campioni della popolazione con risultati positivi, negativi o non validi/indeterminati provenienti da IdentiClone Dx *IGH* Assay e risultati positivi o negativi provenienti dal metodo di riferimento.

12.12.4. Selezione di pazienti e aliquote per IdentiClone Dx *IGH* Assay

- 12.12.4.1. Il disegno dello studio ha utilizzato campioni di DNA residuo deidentificati provenienti da test clinici e, pertanto, era esente dalla richiesta del consenso ai singoli soggetti.
- 12.12.4.2. Nel set di analisi finale utilizzato per valutare gli obiettivi primari è stato incluso un solo campione per ciascun soggetto.

12.12.5. Analisi di sicurezza

- 12.12.5.1. Non si prevede che IdentiClone Dx *IGH* Assay comporti un rischio diretto per la sicurezza dei soggetti e nessuna decisione terapeutica è stata presa sulla base dei risultati ottenuti con IdentiClone Dx *IGH* Assay.

12.12.6. Efficacia

12.12.6.1. Convalida clinica primaria di IdentiClone Dx *IGH* Assay

- 12.12.6.1.1. L'intento primario di questo studio clinico stabilisce la concordanza tra il dispositivo sperimentale (IdentiClone Dx *IGH* Assay) e un saggio di riferimento (saggio IVD disponibile in commercio [al momento dello studio] che applica l'NGS per rilevare riarrangiamenti clonali del gene *IGH*, con una destinazione d'uso simile al dispositivo sperimentale).
- 12.12.6.1.2. La Tabella 23 mostra la concordanza tra i risultati di clonalità del dispositivo sperimentale (IdentiClone Dx *IGH* Assay) e del saggio di riferimento. Dei 249 campioni valutabili con il metodo di riferimento, 243 hanno riportato lo stesso risultato con entrambi i metodi.

Tabella 23. Concordanza tra IdentiClone Dx IGH Assay (IUO) e il saggio di riferimento (IVD), inclusi i soggetti sani

IdentiClone Dx IGH Assay (IUO)	Saggio di riferimento (IVD)		
	+	-	Totale
+	129	1	130
-	5	114	119
Totale	134	115	249

- 12.12.6.1.3. Tabella 24 riporta in dettaglio la concordanza tra i risultati di clonalità ottenuti con IdentiClone Dx IGH Assay (IUO) e quelli ottenuti con il saggio di riferimento (IVD) basato su NGS. Dei 249 campioni valutabili analizzati, 114 dei 115 campioni negativi (-) hanno mostrato concordanza tra i due metodi; 129 dei 134 campioni positivi (+) erano concordanti, con una NPA del 99,1% e una PPA del 96,3%. Il limite inferiore dell'intervallo di confidenza (IC) al 95% per la NPA è del 95,3%, mentre il limite inferiore dell'IC al 95% per la PPA è del 91,5%; la Tabella 24 riporta in dettaglio la concordanza tra il dispositivo sperimentale e il metodo di riferimento. Nella Tabella 25 sono riportati i rapporti di probabilità positiva e negativa.

Tabella 24. Concordanza tra il dispositivo sperimentale e il saggio di riferimento

Misura della concordanza	Percentuale di concordanza (n/N)	IC al 95% ¹
NPA	99,1% (114/115)	(95,3%, 100,0%)
PPA	96,3% (129/134)	(91,5%, 98,8%)

¹L'IC al 95% è calcolato con il metodo esatto (Clopper-Pearson).

Tabella 25. Rapporto di probabilità tra IdentiClone Dx IGH Assay e il saggio di riferimento (IVD), inclusi i soggetti sani

Rapporto di probabilità di risultato positivo	Rapporto di probabilità di risultato negativo
110,709	0,038

- 12.12.6.1.4. La Tabella 26 presenta la concordanza tra i risultati di clonalità del dispositivo sperimentale e del saggio di riferimento *senza* i soggetti sani. Dei 203 campioni valutabili con il metodo di riferimento, 197 hanno riportato lo stesso risultato con entrambi i metodi.

Tabella 26. Concordanza tra IdentiClone Dx IGH Assay (IUO) e saggio di riferimento (IVD), esclusi i soggetti sani

IdentiClone Dx IGH Assay (IUO)	Saggio di riferimento (IVD) basato su NGS		
	+	-	Totale
+	128	1	129
-	5	69	74
Totale	133	70	203

- 12.12.6.1.1. La concordanza si basa sui risultati di clonalità ottenuti con il dispositivo sperimentale e il saggio di riferimento, *esclusi* i soggetti sani (Tabella 27). Dei 203 campioni valutabili testati, 69 dei 70 campioni negativi (-) erano concordanti tra entrambi i metodi; 128 dei 134 campioni positivi (+) erano concordanti, con una NPA del 98,6% e una PPA del 96,2%. Il limite inferiore dell'IC al 95% per la NPA è pari al 92,3%, mentre il limite inferiore dell'IC al 95% per la PPA è pari al 91,4%. I rapporti di probabilità positiva e negativa sono riportati nella Tabella 28.

Tabella 27. Concordanza tra IdentiClone Dx IGH Assay (IUO) e saggio di riferimento (IVD), esclusi i soggetti sani

Misura della concordanza	Percentuale di concordanza (n/N)	IC al 95% ¹
NPA	98,6% (69/70)	(92,3%, 100,0%)

Tabella 27. Concordanza tra IdentiClone Dx *IGH* Assay (IUO) e saggio di riferimento (IVD), esclusi i soggetti sani

Misura della concordanza	Percentuale di concordanza (n/N)	IC al 95% ¹
PPA	96,2% (128/133)	(91,4%, 98,8%)

¹L'IC al 95% è calcolato con il metodo esatto (Clopper-Pearson).

Tabella 28. Rapporto di probabilità tra IdentiClone Dx *IGH* Assay e il saggio di riferimento (IVD), esclusi i soggetti sani

Rapporto di probabilità di risultato positivo	Rapporto di probabilità di risultato negativo
67,368	0,038

12.12.7. Conclusioni

- 12.12.7.1. Questa valutazione clinica di IdentiClone Dx *IGH* Assay conferma che il dispositivo sperimentale rileva in modo accurato gli eventi clonali nel gene della catena pesante delle immunoglobuline (*IGH*).
- 12.12.7.2. Questo studio cardine sull'accuratezza fornisce evidenze documentate che il dispositivo sperimentale e il metodo di riferimento (dispositivo di riferimento) presentano tassi di rilevamento simili per gli eventi clonali di *IGH*. Gli obiettivi primari di concordanza sono stati fissati al 70% del limite inferiore dell'IC al 95% sia per NPA sia per PPA, in considerazione delle marcate differenze tra le due tecnologie. Tuttavia, i risultati dello studio dimostrano che queste due tecnologie identificano gli eventi clonali a un tasso molto simile.
- 12.12.7.3. Il DNA residuo deidentificato estratto da campioni di sangue periferico (PB) provenienti da soggetti con sospette patologie linfoproliferative a cellule B è stato analizzato con entrambi i metodi. Un sottogruppo di 249 campioni ha generato risultati valutabili con entrambi i saggi e il criterio di accettazione dello studio è stato soddisfatto:
- 12.12.7.3.1. Il limite inferiore dell'IC esatto al 95% della NPA doveva essere pari o superiore al 70%. Il limite inferiore raggiunto era pari al 95%.
- 12.12.7.3.1.1. La specificità diagnostica calcolata è pari a 0,991.
- 12.12.7.3.1.2. Rapporto di probabilità di risultato negativo: 0,038
- 12.12.7.3.2. Il limite inferiore dell'IC esatto al 95% della PPA era pari o superiore al 70%. Il limite inferiore raggiunto era pari al 92%.
- 12.12.7.3.2.1. La sensibilità diagnostica calcolata è pari a 0,963.
- 12.12.7.3.2.2. Rapporto di probabilità di risultato positivo: 110,709
- 12.12.7.4. Con il metodo sperimentale sono stati ottenuti un risultato falso positivo e cinque falsi negativi.
- 12.12.7.5. Questa valutazione clinica di IdentiClone Dx *IGH* Assay conferma che il dispositivo sperimentale rileva in modo accurato gli eventi clonali nel gene *IGH*.
- 12.12.7.6. Non sono stati identificati problemi di sicurezza durante la conduzione di questo studio.

13. Bibliografia

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 PTJA, 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 κ 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) [1]: 603-609.
 - IdentiClone Dx IGH Software Instructions for Use – English (Invivoscribe : 310000)
 - ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer User Manual (Thermo Fisher: 100079380 Revision D)
 - ABI 3500xL Genetic Analyzer User Manual (Thermo Fisher: 4401661 Revision C)

14. Assistenza tecnica e Servizio clienti

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

Invivoscribe, Inc

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego, CA | 92121-2711 | Stati Uniti










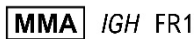

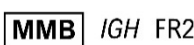

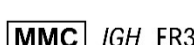





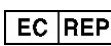

Sito Web: www.invivoscribe.com | Orari: 7:00-17:00 (fuso orario del Pacifico)

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

Assistenza tecnica: support@invivoscribe.com | Servizio clienti: sales@invivoscribe.com

15. Simboli

Sulle etichette di questo prodotto sono utilizzati i seguenti simboli.

	Numero di catalogo		DNA polimerasi Taq
	Volume del reagente		Controllo positivo <i>IGH</i>
	Numero di lotto		Controllo negativo
	Condizioni di conservazione		Controllo senza template (NTC)
	Identificatore unico del dispositivo		MMA <i>IGH</i> FR1 (master mix A)
	Data di scadenza		MMB <i>IGH</i> FR2 (master mix B)
	Tenere al riparo dalla luce		MMC <i>IGH</i> FR3 (master mix C)
	Fabbricante		Consultare le Istruzioni per l'uso
	Conformità europea		Mandatario per la Svizzera
	Per uso diagnostico <i>in vitro</i>		Mandatario nella Comunità Europea
			Responsabile nel Regno Unito

16. Avviso legale

Per gli avvisi legali relativi a questo prodotto, visitare: <https://invivoscribe.com/legal-notice/>

17. Cronologia delle revisioni

Tabella 29. Cronologia delle revisioni delle IFU di IdentiClone Dx *IGH* Assay e convalida da parte dell'organismo notificato

Revisione delle IFU	Data di emissione	Descrizione della modifica	Revisione convalidata dall'organismo notificato
H	Dicembre 2025	Rilascio iniziale per l'invio all'organismo notificato.	<input checked="" type="checkbox"/> Sì Lingua di convalida: Inglese <input type="checkbox"/> No