

Brugsanvisning



## IdentiClone® T-Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0

Til identifikation af T-celle-klonalitet.

 Til *in vitro*-diagnostisk brug Opbevaringsbetingelser: **-85°C til -65°C**  
(DNA-kontroller kan skilles fra analysekittene og opbevares mellem 2°C og 8°C)

Katalognummer	Produkter	Antal
 92070101	IdentiClone T-Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0 – ABI Fluorescence Detection	33 reaktioner
 92070111	IdentiClone T-Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0 MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 reaktioner

# Indholdsfortegnelse

<b>1.</b>	<b>TILSIGTET ANVENDELSE.....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>INFORMATION OM OG FORKLARING AF TESTEN .....</b>	<b>3</b>
2.1.	Baggrund .....	3
2.2.	Sammendrag.....	3
<b>3.</b>	<b>TESTPRINCIP .....</b>	<b>4</b>
3.1.	Polymerasekædereaktion (PCR).....	4
3.2.	Fluorescenspåvisning.....	4
<b>4.</b>	<b>REAGENSER.....</b>	<b>5</b>
4.1.	Reagenskomponenter .....	5
4.2.	Advarsler og forholdsregler .....	5
4.3.	Opbevaring og håndtering .....	6
<b>5.</b>	<b>INSTRUMENTER .....</b>	<b>6</b>
5.1.	Termocykler .....	6
5.2.	ABI-kapillær elektroforese-instrumenter.....	6
<b>6.</b>	<b>INDSAMLING OG KLARGØRING AF PRØVEMATERIALE .....</b>	<b>7</b>
6.1.	Forholdsregler .....	7
6.2.	Interfererende stoffer .....	7
6.3.	Krav til prøvemateriale samt håndtering .....	7
6.4.	Klargøring af prøve .....	7
6.5.	Prøveopbevaring .....	7
<b>7.</b>	<b>ANALYSEPROCEDURE.....</b>	<b>7</b>
7.1.	Medfølgende materialer.....	7
7.2.	Nødvendige materialer (der ikke medfølger).....	8
7.3.	Klargøring af reagenser .....	9
7.4.	Amplifikation.....	10
7.5.	ABI-fluorescenspåvisning .....	10
7.6.	Analysering af data .....	11
7.7.	Kvalitetskontrol .....	12
7.8.	Analysekontrol .....	12
<b>8.</b>	<b>FORTOLKNING AF RESULTATER.....</b>	<b>13</b>
8.1.	Analyse.....	13
8.2.	Fortolkning af prøver .....	13
<b>9.</b>	<b>PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER.....</b>	<b>14</b>
<b>10.</b>	<b>FORVENTEDE VÆRDIER .....</b>	<b>14</b>
10.1.	Forventet størrelse på amplificerede produkter.....	14
10.2.	Prøvedata.....	14
<b>11.</b>	<b>KARAKTERISTIKA FOR YDEEVNEN .....</b>	<b>15</b>
<b>12.</b>	<b>TEKNISK ASSISTANCE OG KUNDESERVICE .....</b>	<b>16</b>
<b>13.</b>	<b>REFERENCER.....</b>	<b>17</b>
<b>14.</b>	<b>SYMBOLER .....</b>	<b>17</b>
<b>15.</b>	<b>JURIDISK MEDDELELSE .....</b>	<b>18</b>
15.1.	Garanti og ansvar .....	18
15.2.	Patenter og varemærker .....	18

## 1. Tilsigtet anvendelse

IdentiClone T-Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0 er et in vitro-diagnostisk produkt, der er beregnet til PCR-baseret påvisning af klonale T-celle-receptor-gammakæde-gen-rearrangementer hos patienter med mulige lymfeproliferationer.

T-Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0 kan specifikt anvendes til at identificere klonalitet i mulige lymfeproliferationer.

## 2. Information om og forklaring af testen

### 2.1. Baggrund

Rearrangementer af antigen-receptor-gener forekommer under ontogenese i B- og T-lymfocytter og genererer produkter, der er unikke i længde og sekvens. Polymerasekædereaktion (PCR)-analyser kan anvendes til at identificere lymfocytpopulationer, der stammer fra en enkelt celle, ved at påvise de unikke V-J-gen-rearrangementer, der findes inden for disse antigen-receptor-loci.<sup>1</sup> Denne IdentiClone PCR-analyse anvender flere konsensus-DNA-primere, der er rettet mod de konserverede genetiske områder inden for T-celle-receptor-gammakæde-genet og amplificerer området med fluorescerende mærkede primere, efterfulgt af fraktionering ved hjælp af kapillær elektroforese og analyse ved hjælp af instrumentsoftware. Denne DNA-baserede test anvendes til at påvise størstedelen af klonale T-celle-populationer. Tilstedeværelse eller fravær af klonalitet kan understøtte differentialdiagnosticering af reaktive læsioner og visse T- og B-celle-maligniteter.

Analysen kan ikke med sikkerhed påvise klonalitet, der er til stede i mindre end 5% af den samlede lymfocytpopulation. Resultaterne af test af molekylær klonalitet skal altid fortolkes i sammenhæng med alle tilgængelige kliniske, histologiske og immunfænotypiske data.

### 2.2. Sammendrag

Dette testkit består af et enkelt mastermix, der indeholder primere, der er rettet mod V $\gamma$ 2-, 3-, 4-, 5-, 8-, 9-, 10- og 11-områderne og J $\gamma$ 1/J $\gamma$ 2-, J $\gamma$ P- og J $\gamma$ P1/J $\gamma$ P2-områderne, som genererer PCR-amplikoner med et forventet størrelsesområde mellem 159 og 207 nukleotider (nt). Specimen Control Size Ladder-mastermixet er rettet mod flere gener og genererer en serie amplikoner på 96, 197, 297, 397 og 602 nukleotider for at sikre, at kvaliteten og kvantiteten af DNA er tilstrækkelig for at kunne give et gyldigt resultat. Proceduren anvender et enkelt termocyclerprogram og tilsvarende påvisningsmetodologi for alle Invivoscribe-genklonalitetsanalyser, der forbedrer ensartetheden og gør det nemmere at krydstræne på et bredt udvalg af forskellige analyser.

Analyse af toppe understøttes af en softwarebaseret algoritme, der udregner det relative forhold mellem top og højde (RPR) og en statistisk parameter værdi D(x) for hver top. RPR beregnes ved at dividere højden på hver top med den mindste af de nærliggende toppe, og den skal ligge over en cutoff på 4,0. D(x)-værdien er baseret på en variation af Kolmogorov-Smirnov-testen, hvor to empiriske fordelinger sammenlignes, og det fastslås, om de er statistisk forskellige. Værdien skal ligge over 0,0419.

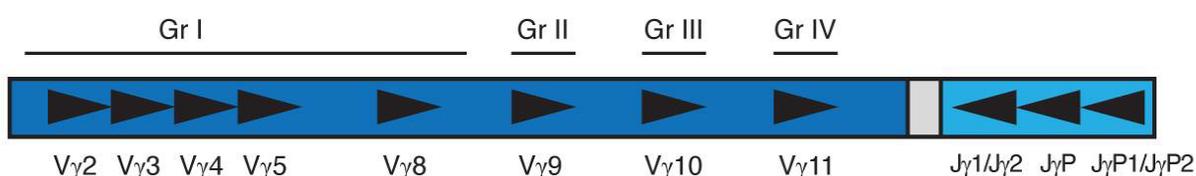
Denne analyse er udviklet af Invivoscribe. Ydeevnen af denne analyse er bedømt og valideret af EuroClonality/BIOMED-2 Group.<sup>2</sup>



## 3. Testprincip

### 3.1. Polymerasekædereaktion (PCR)

PCR-analyser anvendes rutinemæssigt til identifikation af klonale T-cellepopulationer. Denne test amplificerer den DNA mellem primere, der er målrettet konserverede områder inden for det variable område (V) og joining-området (J), der ligger op til det unikke hypervariable antigen-bindingsområde 3 (CDR3). Disse konserverede områder ligger på begge sider af et område inden for V-J-området, hvor der sker programmerede genetiske rearrangementer under modningen af alle B- og T-lymfocytter. De antigen-receptor-gener, der gennemgår rearrangering, er immunoglobulin tung kæde og lette kæder i B-celler og T-celle-receptor-gener i T-celler. Hver B- og T-celle har et enkelt produktivt V-J-rearrangement, der er unikt i både længde og sekvens. Derfor vil der, når DNA fra en normal eller polyklonal population amplificeres ved hjælp af primere, der ligger op til V-J-området, blive genereret en gaussisk fordeling (klokeformet kurve) af ampikon-produkter inden for et forventet størrelsesinterval. Denne gaussiske fordeling afspejler den heterogene population af V-J-rearrangementer. (I visse tilfælde, hvor der ikke er noget lymfocyt DNA til stede, kan der ikke påvises et produkt.) DNA fra prøver, der indeholder en klonal population, giver et eller to fremtrædende amplificerede produkter (ampikoner) inden for en formindsket polyklonal baggrund.



**Figur 1.** Dette diagram over T-celle-receptor-gamma-genet viser den omtrentlige placering af upstream- og downstream DNA-primere.

Da antigen-receptor-generne er polymorfe (består af en heterogen population af relaterede DNA-sekvenser), er det vanskeligt at anvende et enkelt sæt af DNA-primarsekvenser til at være målrettet alle de konserverede omgivende områder rundt om V-J-rearrangementet. N-områdets diversitet og somatisk mutation forstyrrer DNA-sekvenserne i disse områder yderligere. Derfor er der brug for et multiplex-mastermix, der er rettet mod flere V- og J-områder (figur 1), til at påvise størstedelen af de klonale rearrangementer. Som angivet identificeres klonale rearrangementer som et eller to fremtrædende produkter af en enkelt størrelse på en baggrund af ampikonprodukter af forskellig størrelse, der danner den gaussiske fordeling rundt om et statistisk begunstiget rearrangement af gennemsnitlig størrelse.

### 3.2. Fluorescenspåvisning

Fluorescenspåvisning anvendes ofte til at afklare ampikonprodukterne i forskellig størrelse ved hjælp af et kapillært elektroforese-instrument. Primere konjugeres med et 6FAM-fluorescerende farvestof (fluorofor), så de kan påvises efter excitation med laser i det kapillære elektroforese-instrument. Dette meget sensitive påvisningssystem sikrer afklaring af størrelse på enkelt nukleotider og relativ kvantificering. Inter- og intra-assay-reproducerbarhed ved størrelsesbestemmelse ved hjælp af kapillær elektroforese er cirka 1-2 nukleotider. Denne reproducerbarhed og sensitivitet sammenkoblet med den automatiske arkivering af prøvedata giver mulighed for monitorering, sporing og sammenligning af data fra individuelle patienter over tid.

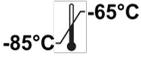
## 4. Reagenser

### 4.1. Reagenskomponenter

Tabel 1. Tilgængelige kits

Katalognummer	Beskrivelse	Antal
<b>REF</b> 92070101	IdentiClone T-Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0 – ABI Fluorescence Detection	33 reaktioner
<b>REF</b> 92070111	IdentiClone T-Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0 MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 reaktioner

Tabel 2. Reagenskomponenter

Reagens	Katalognummer	Reagenskomponenter (aktive ingredienser)	Enheds-mængde	92070101 Antal enheder	92070111 Antal enheder	Opbevar.-temp.
Mastermix	22070091CE	<b>TCRG – 6FAM</b> Flere oligonukleotider, der er rettet mod Vy2-, 3-, 4-, 5-, 8-, 9-, 10-, & 11- og Jy1/Jy2-, JyP- og JyP1/JyP2-områder i T-celle-receptor-gamma-genet i en bufferet saltopløsning.	1500 µL	1	10	
Template Amplification Control Master Mix	20960021	<b>Specimen Control Size Ladder – 6FAM</b> Flere oligonukleotider rettet mod "housekeeping"-gener.	1500 µL	1	10	
Positiv kontrol-DNA	40883320	<b>5% TCRG Positive Control DNA</b> 50 µg/mL DNA i 1/10 TE-opløsning	50 µL	1	5	eller 
Negativ (normal) kontrol-DNA	40920020	<b>TCRG Negative Control DNA</b> 50 µg/mL DNA i 1/10 TE-opløsning	50 µL	1	5	

**Bemærk:** Der er ikke anvendt konserveringsmidler i forbindelse med fremstillingen af dette kit.

### 4.2. Advarsler og forholdsregler

- **IVD** Dette produkt er beregnet til *in vitro*-diagnostisk brug.
- Dette analysekit skal anvendes som et system. Udskift ikke reagenser med reagenser fra andre producenter. Fortynding, reducere af amplifikationsvolumener eller andre afvigelser fra denne protokol kan påvirke ydeevnen for denne test og/eller annullere eventuelle begrænsede underlicenser, der følger med købet af dette testkit.
- Materialerne vil være stabile indtil den udløbsdato, der er angivet, når de opbevares og håndteres som anvist. Anvend ikke kits efter deres udløbsdato.
- Omhyggelig efterlevelse af protokollen vil sikre optimal ydeevne og reproducerbarhed. Sørg for at anvende det korrekte termocyklerprogram, da andre programmer kan give unøjagtige/forkerte data, eksempelvis falsk-positive og falsk-negative resultater.
- Bland eller kombiner ikke reagenser fra kits med forskellige lotnumre.
- Bær passende personligt beskyttelsesudstyr, og følg god laboratoriepraksis og almene forsigtighedsregler under arbejdet med prøver. Håndter prøverne i lukkede faciliteter, der er godkendte til biologisk sikkerhed, og åbn dem kun i certificerede biologiske sikkerhedsskabe. Anvend glasdestilleret deioniseret vand af molekylærbiologisk kvalitet til klargøring af prøve-DNA.
- Grundet denne tests høje analytiske sensitivitet skal der udvises meget stor forsigtighed for at undgå, at reagenser eller amplifikationsblandinger kontamineres med prøver, kontroller eller amplificeret materiale. Overvåg nøje alle reagenser for tegn på kontaminering (f.eks. negative kontroller, der giver positive signaler). Kassér reagenser, hvor der er mistanke om kontaminering.
- Minimer kontamineringsrisikoen ved at bære rene handsker ved håndtering af prøver og reagenser og rutinemæssigt rengøre arbejdsområder og pipetter inden udførelse af PCR.
- Autoklaving kan ikke eliminere DNA-kontaminering. Sørg altid for en envejsarbejdsangang i PCR-laboratoriet: Begynd med klargøring af mastermix, gå videre til klargøring af prøver, derefter til amplifikation og til sidst til detektion. Sørg for, at der ikke kommer amplificeret DNA i de områder, der er beregnet til mastermix eller klargøring af prøvemateriale.
- Dediker alle pipetter, pipettespidser og alt udstyr, der har været anvendt på et bestemt område, til det pågældende område i laboratoriet.
- Anvend sterilt engangsplastik, når det er muligt, for at undgå RNase, DNase og krydskontaminering.

### 4.3. Opbevaring og håndtering

- Hvis analysekittet ikke skal anvendes med det samme, skal analysekit opbevares ved en temperatur på mellem -85°C til -65°C.
- Den optimale opbevaringstemperatur for DNA-kontroller er mellem 2°C til 8°C, men DNA kan også opbevares ved -85°C til -65°C.
- Alle reagenser og kontroller skal optøes og vortex-mixes eller blandes grundigt før brug for at sikre, at de er helt blandede. Overdreven vortex-mixning kan dog betyde, at mærkede primere vil miste fluoroforen.
- Materialerne vil være stabile indtil den udløbsdato, der er angivet, når de opbevares og håndteres som anvist. Anvend ikke kits efter deres udløbsdato.
- PCR-mastermixene og kontrollerne er blevet valideret til 6 cyklusser med nedfrysning og optøning uden tab af ydeevne. Hvis der er behov for yderligere cyklusser med nedfrysning og optøning, må reagenserne udportioneres i sterile rør med o-ring-skruelåg.

## 5. Instrumenter

### 5.1. Termocykler

- Brug eller funktion: Amplifikation af DNA-prøver
- Specifikation og karakteristika for ydeevnen:
  - Min. varmeinterval: 15°C til 96°C
  - Min. rampinghastighed: 0,8°C/sek.
- Følg producentens procedurer for installation, drift, kalibrering og vedligeholdelse.
- Læs mere om termocyklerprogrammer i afsnit 7.4: *Amplifikation*.

### 5.2. ABI-kapillær elektroforese-instrumenter

- Brug eller funktion: Fragmentpåvisning og analyse
- Specifikation og karakteristika for ydeevnen:
  - Følgende kapillær elektroforese-instrumenter kan opfylde kravene til ydeevne for denne analyse:
    - ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (4 kapillærer)
    - ABI 3100 Genetic Analyzer (16 kapillærer)
    - ABI 3130 Genetic Analyzer (4 kapillærer)
    - ABI 3130XL Genetic Analyzer (16 kapillærer)
    - ABI 3500XL Genetic Analyzer (24 kapillærer)
- Følg producentens procedurer for installation, drift, kalibrering og vedligeholdelse.
- Det anvendte ABI-instrument skal kalibreres med de relevante matrixstandarder, som angivet i afsnit 7.2: *Nødvendige materialer, der ikke medfølger*
- Brug standardindstillingerne for din polymer- og kapillærtype.
- Se mere i afsnit 7.5: ABI-fluorescenspåvisning.

\*Advarsel: Disse produkter er ikke CE-mærkede

## 6. Indsamling og klargøring af prøvemateriale

### 6.1. Forholdsregler

Biologisk prøvemateriale fra mennesker kan indeholde potentielt smittefarlige materialer. Alle prøver skal håndteres i overensstemmelse med OSHA-standarden for blodbårne patogener eller Biosikkerhed niveau 2.

### 6.2. Interfererende stoffer

Følgende stoffer vides at interferere med PCR:

- Divalente kationchelater
- Pipettespidser med lav retention
- EDTA
- Heparin

### 6.3. Krav til prøvemateriale samt håndtering

Denne analyse bruges til test af genomisk DNA, der er ekstraheret og oprenset fra perifert blod, knoglemarvsaspirat eller paraffinindstøbt væv.

### 6.4. Klargøring af prøve

Ekstraher hurtigst muligt det genomiske DNA fra patientprøverne. Resuspender DNA til en slutkoncentration på 10 µg til 200 µg pr. mL i 1/10 TE (1 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 mM EDTA) eller i vand af molekylærbioologisk kvalitet eller USP-vand. Dette er et robust analysesystem. Et bredt udvalg af DNA-koncentrationer vil generere et gyldigt resultat. Derfor er det normalt ikke nødvendigt at kvantificere eller justere DNA-koncentrationerne. Test af prøve-DNA med Specimen Control Size Ladder-mastermix vil sikre, at der findes DNA af tilstrækkelig kvalitet og kvantitet til at kunne give et gyldigt resultat.

### 6.5. Prøveopbevaring

Genomisk DNA bør opbevares ved 2°C til 8°C eller langtidsopbevares ved -85°C til -65°C.

## 7. Analyseprocedure

### 7.1. Medfølgende materialer

Tabel 3. Medfølgende materialer.

Katalognummer	Beskrivelse
22070091CE	TCRG – 6FAM
20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM
40883320	5% TCRG Positive Control DNA
40920020	TCRG Negative Control DNA

## 7.2. Nødvendige materialer (der ikke medfølger)

Tabel 4. Nødvendige materialer (der ikke medfølger)

Reagens/materiale	Anbefalede reagenser/materialer og leverandører	Katalognummer	Bemærkninger
DNA-polymerase	Roche: <ul style="list-style-type: none"> <li>EagleTaq DNA Polymerase</li> </ul> Invivoscribe, Inc.: <ul style="list-style-type: none"> <li>FalconTaq DNA Polymerase eller tilsvarende</li> </ul>	05206944190 60970130	N/A
Glasdestilleret deioniseret vand af molekylærbiologisk kvalitet eller USP-vand	N/A	N/A	Vandet skal være sterilt og fri for DNase og RNase.
Kalibrerede pipetter	N/A	N/A	Skal kunne afmåle volumener mellem 1 µL og 1000 µL nøjagtigt.
Termocykler	N/A	N/A	N/A
Vortex-mixer	N/A	N/A	N/A
PCR-plader eller -rør	N/A	N/A	Sterile
Pipettespidser med filterbarriere	N/A	N/A	Sterile, RNase/DNase/pyrogen-frie
Mikrocentrifugerør	N/A	N/A	Sterile
Hi-Di Formamid	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hi-Di™-formamid</li> </ul>	4311320	N/A
ABI-kapillær elektroforese-instrument	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>ABI 3100-, 3130- eller 3500-series</li> </ul>	N/A	N/A
Størrelsesstandarder	Invivoscribe, Inc.: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hi-Di-formamid m./ROX-størrelsesstandarder til ABI 3100</li> </ul> Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Til ABI 3100- eller 3130-instrumenter: <ul style="list-style-type: none"> <li>GeneScan™ - 400HD [ROX]™</li> </ul> </li> <li>Til ABI 3500-instrumenter: <ul style="list-style-type: none"> <li>GeneScan - 600 [LIZ]™ v2.0</li> </ul> </li> </ul>	60980061 402985 4408399	N/A
Farvesæt til spektral kalibrering	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Til ABI 3100- og 3130-instrumenter: <ul style="list-style-type: none"> <li>DS-30 matrixstandardkit (farvesæt D)</li> </ul> </li> <li>Til ABI 3500-instrumenter: <ul style="list-style-type: none"> <li>DS-33 matrix-standardkit (farvesæt G5)</li> </ul> </li> </ul>	4345827 4345833	N/A
Polymer	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>POP-7 Polymer: <ul style="list-style-type: none"> <li>POP-7™ til 3130/3130XL/3500XL Genetic Analyzers</li> </ul> </li> </ul>	4352759	N/A

### 7.3. Klargøring af reagenser

- Alle prøver kan testes ved hjælp af Specimen Control Size Ladder-mastermix for at sikre, at der ikke findes amplifikationsinhibitorer, og at der findes DNA af tilstrækkelig kvalitet og kvantitet til at kunne generere et gyldigt resultat.
- Test prøverne med dobbeltbestemmelse. Hvis dobbeltbestemmelsen giver inkonsekvente resultater, må prøven gentestes eller reevalueres.
- Positive, negative og no template-kontroller skal testes.

7.3.1. Tag handsker på, og tag mastermixene ud af fryseren. Lad rørene tøj helt op, og vortex-mix derefter forsigtigt for at blande.

7.3.2. Overfør den beregnede volumen fra hvert mastermix til de enkelte mikrocentrifugerør.

- Der skal udmåles en volumen på 45 µL for hver reaktion.
- Tilsæt 15% ekstra for at sikre, at der vil være en tilstrækkelig volumen.
- For *TCRG* – 6FAM-mastermixet er antallet af reaktioner (**n**):

<b>n = 2 × antal prøver</b>	(Kør hver prøve i dobbeltbestemmelse)
+ 1	5% <i>TCRG</i> Positive Control DNA
+ 1	<i>TCRG</i> Negative Control DNA
+ 1	No Template Control (vand)
+ 1	Ekstra reaktion

---

**n = 2 × antal prøver + 4**                      **I alt**

- Den samlede udmålte volumen for *TCRG* – 6FAM mastermix er **n × 45 µL**.
- For Specimen Control Size Ladder-mastermix vil antallet af reaktioner (**m**) være:

<b>m = antal prøver</b>	(Kør hver prøve i enkeltbestemmelse)
+ 1	<i>TCRG</i> Negative Control DNA
+ 1	No Template Control (vand)
+ 1	Ekstra reaktion

---

**m = antal prøver + 3**                      **I alt**

- Den samlede udmålte volumen for Specimen Control Size Ladder-mastermix er **m × 45 µL**.

7.3.3. Tilsæt 1,25 enheder (eller 0,25 µL ved 5 enheder/µL) Taq DNA-polymerase pr. reaktion til hvert mastermix.

- Tilsæt **n × 0,25 µL** Taq DNA-polymerase til *TCRG*-mastermix og **m × 0,25 µL** Taq DNA-polymerase til Specimen Control Size Ladder-mastermix. Vortex-mix forsigtigt for at blande.

7.3.4. For hver reaktion udmåles 45 µL af det relevante mastermix + DNA-polymeraseopløsning i de enkelte brønde på en PCR-plade eller et rør.

7.3.5. Tilsæt 5 µL relevant template (prøve-DNA, positiv kontrol-DNA, negativ kontrol-DNA eller vand) til de enkelte brønde, der indeholder de respektive mastermix-opløsninger. Pipetter op og ned flere gange for at blande.

7.3.6. Sæt låg på PCR-pladen eller dæk den til.

- Prøverne er nu klar til at blive amplificeret på en termocykler.

#### Lynguide

For hvert mastermix og **n** reaktioner blandes:

<b>n × 45 µL</b>	Mastermix
<b>n × 0,25 µL</b>	Taq DNA-polymerase

Vortex-mix forsigtigt for at blande.

Udmål **45 µL** mastermix + DNA-polymeraseopløsning i hver reaktionsbrønd.

Tilsæt **5 µL** relevant template til hver brønd.

---

**Reaktionsvolumen i alt =**                      **50 µL**

## 7.4. Amplifikation

### 7.4.1. Amplificer prøverne ved hjælp af følgende PCR-program:

- Brug den **forudberegne**de indstilling til temperaturmåling med BioRad MJ Research PTC-termocyklere.

**Tabel 5.** Indstillinger for termocykler

Trin	Temperatur	Varighed	Cyklus
1	95°C	7 minutter	1
2	95°C	45 sekunder	35
3	60°C	45 sekunder	
4	72°C	90 sekunder	
5	72°C	10 minutter	1
6	15°C	∞	1

### 7.4.2. Fjern amplifikationspladen eller rørene fra termocyklere.

- Selvom amplificeret DNA er stabilt ved stuetemperatur i længere tid, bør PCR-produkter opbevares ved 2°C til 8°C indtil påvisning.
- Påvisning skal ske inden for 30 dage efter amplificeringen.

## 7.5. ABI-fluorescenspåvisning

Bemærk, at der ofte ses en forudgående top ved ABI-fluorescenspåvisning. Denne er et artefakt og skyldes den påvisningsmetode, der anvendes for ABI-plattformene. De forudgående toppe er sommetider skæve og har baser, der hælder til højre mod den virkelige top. Dette ses især ved Specimen Control Size Ladder-mastermixet, hvor toppen for 96-nukleotiden (nt) har en forudgående top, der vises ved 84 nukleotider (nt).

### ABI 3100- og 3130-platforme:

- 7.5.1. I et nyt mikrocentrifugerør blandes en passende mængde (10 µL pr. reaktion) Hi-Di-formamid med ROX-størrelsesstandarder. Vortex-mix godt.
- 7.5.2. I en ny 96-brønds PCR-plade tilsættes 10 µL Hi-Di-formamid med ROX-størrelsesstandarder til individuelle brønde for hver reaktion.
- 7.5.3. Overfør 1 µL af hver reaktion til de brønde, der indeholder Hi-Di-formamid med ROX-størrelsesstandarder.
  - Tilsæt kun én prøve pr. brønd.
  - Pipettér op og ned for at blande.
- 7.5.4. Sæt låg på PCR-pladen eller dæk den til.
- 7.5.5. Denaturér prøverne ved opvarmning ved 95°C i 2 minutter, og lynafkøl dem derefter på is i 5 minutter.
- 7.5.6. Klargør et **prøveark** og en **injektionsliste** for prøverne.
- 7.5.7. Kør prøverne på et ABI 3100/3130 kapillær elektroforese-instrument i henhold til brugermanualen for det pågældende instrument.
  - Data vises automatisk som størrelses- og farvespecifikke toppe.
- 7.5.8. Gennemse profil og kontroller, og rapportér derefter resultaterne. (Se afsnit 8: *Fortolkning af resultater* og 10: *Forventede værdier*)

## ABI 3500-platforme:

- 7.5.9. I et nyt mikrocentrifugerør blandes en passende mængde (9,5 µL pr. reaktion) Hi-Di-formamid med LIZ-størrelsesstandarder. Vortex-mix godt.
- 7.5.10. I en ny 96-brønds PCR-plade tilsættes 9,5 µL Hi-Di-formamid med LIZ-størrelsesstandarder til individuelle brønde for hver reaktion.
- 7.5.11. Overfør 0,5 µL af hver reaktion til de brønde, der indeholder Hi-Di formamid med LIZ-størrelsesstandarder.
  - Tilsæt kun én prøve pr. brønd.
  - Pipetter op og ned for at blande.
- 7.5.12. Sæt låg på PCR-pladen eller dæk den til.
- 7.5.13. Denaturér prøverne ved opvarmning ved 95°C i 3 minutter, og lynafkøl dem derefter på is i 5 minutter.
- 7.5.14. Klargør et **prøveark** og en **injektionsliste** for prøverne.
- 7.5.15. Kør prøverne på et ABI 3500 kapillær elektroforese-instrument i henhold til brugermanualen for det pågældende instrument.
  - Data vises automatisk som størrelses- og farvespecifikke toppe.
- 7.5.16. Gennemse profil og kontroller, og rapportér derefter resultaterne. (Se afsnit 8: *Fortolkning af resultater* og 10: *Forventede værdier*)

## 7.6. Analysering af data

TCRG-algoritme-regnearket er blevet udviklet til analyse af TCRG V2-dataoutput.

- 7.6.1. Åbn **TCRG-algoritme-regnearket** (regnearket kræver Microsoft Excel).
- 7.6.2. Tilføj rådatafiler fra CE-analyse til et nyt projekt i *GeneMapper*-software.
- 7.6.3. Verificer, at den valgte **Analysis Method** (analysemetode) er *Microsatellite Default*, samt at den relevante *Size Standard* (størrelsesstandard) er valgt.
  - Det kan være nødvendigt at sænke grænsen for *Minimum Peak Height* (minimumshøjden for toppe) for at kunne påvise alle toppe i en gaussisk fordeling.
    - Dette gøres ved at vælge **GeneMapper Manager** i menuen *Tools* (Funktioner), gå ind på fanen **Analysis Methods** (Analysemetoder) og åbne **Analysis Method Editor** (analysemetodeeditor) *Microsatellite Default*.
    - Gå ind på fanen *Peak Detector* (Toppåvisning), vælg **User Specified (rfu)** toggle (Brugerdefineret (rfu) skift), og angiv den ønskede tophøjde for *Blue* dye (Blå farve).
- 7.6.4. Vælg **Analyze** (Analysér) i menuen *Analysis* (Analyse).
- 7.6.5. Åbn det tilhørende visningsdiagram for hver analyseret prøvefil.
- 7.6.6. For at sikre, at kun den blå farve vises i visningsdiagrammet, skal du gå ind i menuen **View** (Vis) og derefter vælge **Dyes** → **Blue Dye** (Farvestoffer → Blåt farvestof).
- 7.6.7. Dernæst vælges **Tables** → **Sizing Table** (Tabeller → Størrelsestabel) i menuen **View** (Vis).
  - Markér toppene i visningsdiagrammet inden for det gyldige størrelsesinterval fra *159 nt til 207 nt*.
- 7.6.8. Under *Sizing Table* (Størrelsestabel) kopieres data fra kolonnerne **Size (nt)** (Størrelse (nt)) og **Height (RFU)** (Højde (RFU)) for de markerede toppe inden for det gyldige størrelsesinterval.
- 7.6.9. Indsæt dataene for topstørrelse og -højde i den ulåste del af TCRG-algoritme-regnearket (cellerne er markeret med gråt).
  - Ved GeneMapper version 3.5 og derunder skal disse data indtastes manuelt i regnearket.
- 7.6.10. Regnearket vil producere en oversigt over *RPR*, *D(x)* og *%RFU (max)* for de fem toppe, der afviger mest signifikant fra en normal gaussisk fordeling.
  - Hvis en top i opsummeringstabellen opfylder kriterierne for en klonal top som defineret i TCRG-algoritme-regnearket, vil der stå **Yes** (Ja) i kolonnen med overskriften *Significant?* (Signifikant?).
  - Hvis en top i opsummeringstabellen ikke opfylder kriterierne for en klonal top som defineret i TCRG-algoritme-regnearket, vil der stå **No** (Nej) i kolonnen med overskriften *Significant?* (Signifikant?).

7.6.11. Følgende kriterier samt de, der er implementeret i regnearket, definerer toppe som **positive for klonalitet**:

- Analyse ved hjælp af regnearket skal ske sammen med visuel bekræftelse af, at regnearket fortolker prøven korrekt.
- Ikke-klonale prøver har en polyklonal baggrund, der nærmer sig en gaussisk fordeling af toppe inden for det gyldige størrelsesinterval. Klonale prøver har normalt en polyklonal baggrund med en gaussisk fordeling inden for det gyldige størrelsesinterval, hvorfra en formodet klonal top udgår som en afvigelse fra den gaussiske fordeling.
- Formodede klonale toppe kan ledsages af tilstødende toppe. En tilstødende top defineres som en top 1 nt upstream eller downstream i forhold til en formodet klonal top, hvor højden er lavere end den nærliggende formodede signifikante top, men højere end baggrundsfordelingen. Tilstødende toppe kan også være forbundet med formodede klonale toppe over basislinjen. Tilstødende toppe betragtes normalt som baggrund og bør ikke evalueres som formodede klonale toppe.
- $D(x)$ -værdien for den formodede klonale top, som udregnet inden for den låste del af regnearket, skal være  **$\geq 0,0419$** .
- $RPR$  for den formodede klonale top (beregnet ved at dividere højden af den formodede klonale top med den højeste del af den mindste af de nærliggende toppe) skal være  **$\geq 4,0X$** .
- $RFU$  for den formodede klonale top skal være  **$\geq 20\%$**  af  $RFU$  for den højeste top i den pågældende prøve.
- Hvis den formodede klonale top opfylder disse kriterier (markeret af regnearket som "signifikant"), er toppen klonal positiv.
- Der skal være en difference på  $\geq 2$  nt mellem to klonale positive toppe.
- Prøverne skal køres som dobbeltbestemmelse for at bekræfte, at begge replikater viser positive resultater for en formodet top.
- Størrelsen på de formodede klonale toppe i begge replikater skal ligge inden for  $\pm 1$  nt fra hinanden.

## 7.7. Kvalitetskontrol

Positive og negative kontroller medfølger i kittet og skal inkluderes ved hver analysekørsel. Derudover skal en no template-kontrol (f.eks. vand) også inkluderes. Der kan også tilføjes en bufferkontrol for at sikre, at den buffer, der anvendes til at resuspendere prøverne, ikke er blevet kontamineret. Værdierne for de positive kontroller er anført i afsnit 10.1 *Forventet størrelse på de amplificerede produkter*. Yderligere kontroller og sensitivitetkontroller (fortyndinger af positive kontroller i vores negative kontrol) kan fås fra Invivoscribe.

## 7.8. Analysekontrol

De amplikonstørrelser, der er anført i tabel 4, er blevet bestemt ved hjælp af en ABI-platform. De amplikonstørrelser, der måles på dit specifikke kapillær elektroforese-instrument, kan variere med 1 til 4 nukleotider (nt) i forhold til de anførte, afhængigt af den anvendte påvisningsplatform og analysesoftwareversion. Når amplikonstørrelsen først er identificeret og bestemt på din specifikke platform, vil den være konsekvent fra kørsel til kørsel.

**Bemærk:** Farve angiver farven på produkter, der genereres med mastermixet ved anvendelse af standardfarvetildelingen på ABI-fluorescenspåvisningssystemer.

Tabel 6. Analysekontroller

Mastermix	Mål	Farve	Kontrol-DNA	Kat. nr.	Produktstørrelse (nt)	Forventede algoritmeresultater
<b>TCRG- 6FAM</b>	Vy1-Vy11 + Jy1/Jy2, JyP, JyP1/JyP2	<b>Blå</b>	<b>Angivet størrelsesinterval</b> 5% TCRG Positive Control DNA	---	<b>159-207</b> 194, 196	En top ved 196 nt blev mærket som "Significant" (Signifikant)
<b>Specimen Control Size Ladder</b>	Flere gener	<b>Blå</b>	TCRG Negative Control DNA	40920020	96, 197, 297, 397, 602 <sup>a</sup>	N/A

<sup>a</sup>**Bemærk:** Da amplificeringen fortrinsvist foretages for mindre PCR-fragmenter, er det ikke usædvanligt, at 602 nt-fragmentet har et formindsket signal eller mangler helt. Ved ABI-fluorescenspåvisning kan det ske, at 602 nt-toppen ikke vises under normale kørselstider. Størrelsen af denne top kan desuden afvige med over 30 nt, når fragmentstørrelsen ekstrapoleres ved hjælp af GeneScan - 400HD [ROX]-størrelsesstandarder.

## 8. Fortolkning af resultater

Selvom positive resultater i høj grad tyder på ondartethed, skal både positive og negative resultater fortolkes i kontekst af alle kliniske informationer og laboratorietestresultater. Størrelsesintervallet for *TCRG* – 6FAM mastermix er blevet bestemt til at ligge mellem 159 nt og 207 nt ud fra test af positive og negative kontrolprøver. Gyldige klonale *TCR*-gamma-rearrangementer kan dog også findes uden for det angivne størrelsesinterval. Produkt(er), der er formodet/formodede *TCR*-gamma-gen-rearrangement(er), der ligger uden for det angivne størrelsesinterval, bør sekventeres for at bekræfte identiteten.

### 8.1. Analyse

- 8.1.1. Prøver, der ikke amplificeres efter gentagne tests, bør rapporteres som **“A result cannot be reported on this specimen because the DNA was of insufficient quantity or quality for analysis”** (Der kan ikke rapporteres et resultat for denne prøve, da DNA’et var af en kvantitet eller kvalitet, der ikke var tilstrækkelig til analyse).
- 8.1.2. Gentag testning, hvis de positive eller negative kontrolreaktioner mislykkes.
- 8.1.3. Hvis prøver, der er kørt i dobbeltbestemmelse, giver forskellige resultater, bør prøverne testes igen og/eller reevalueres for at sikre, at prøverne ikke er blevet ombyttet.
- 8.1.4. Undersøg alle analysekontroller inden fortolkning af prøveresultater. Hvis kontrollerne ikke giver de korrekte resultater, er analysen ikke gyldig, og prøverne må ikke fortolkes.

**Table 7.** I det følgende beskrives analysen af hver enkelt kontrol og de beslutninger, det er nødvendigt at træffe ud fra resultaterne.

Kontroltype	Forventet resultat	Afvigende resultat
<b>NTC (No Template Control)</b>	Ingen amplifikation til stede: Fortsæt med analysen	Amplifikation til stede: Kontrollér eventuel forekomst af kontamination, og gentag analysen.
<b><i>TCRG</i> Negative Control</b>	Normal gaussisk fordeling fra 159 nt til 207 nt. Algoritme-regnearket har ikke markeret klonale toppe. Fortsæt med analysen.	Algoritme-regnearket har markeret en eller flere toppe som “Significant” (Signifikant). Gentag analysen.
<b>5% <i>TCRG</i> Positive Control</b> (Dette kan også fungere som en ekstraktionskontrol, hvis positivt kontrolmateriale gennemgår ekstraktionsprocesser)	Toppe til stede ved 194 nt, 196 nt. Algoritme-regnearket markerer som minimum de 196 nt som “Significant” (Signifikant). 194 nt-toppen kan være identificeret som “Significant”, men det er ikke et krav. Fortsæt med analysen.	Algoritme-regnearket markerer ikke toppen ved 196 nt som “Significant” (Signifikant): Gentag analysen.
<b>Specimen Control Size Ladder</b>	Hvis der ses toppe ved 96, 197, 297 og 397 nt, fortsættes med analysen. Da amplificeringen fortrinsvist foretages for mindre PCR-fragmenter, er det ikke usædvanligt, at 602 nt-fragmentet har et formindsket signal eller mangler helt.	Hvis der ikke påvises toppe, gentages analysen, <u>medmindre prøven (specimen control) testes positiv.</u> Hvis der kun er 96, 197 eller 297 nt toppe til stede, reevalueres prøven mht. forringelse af DNA, <u>medmindre prøven (specimen control) testes positiv.</u>

### 8.2. Fortolkning af prøver

Under forudsætning af, at kontrollerne producerer de forventede resultater, skal de kliniske prøver fortolkes på følgende måde:

- 8.2.1. En eller to signifikante toppe markeret af algoritme-regnearket inden for det gyldige størrelsesinterval rapporteres som: **“Positive for the detection of clonal T cell receptor gamma chain gene rearrangement(s) consistent with the presence of a clonal cell population. (Positive for påvisning af klonale T-celle-receptor-gammakæde-gen-rearrangement(er) er ensbetydende med en klonal cellepopulation). In the context of overall diagnostic criteria, clonal cell populations can indicate the presence of hematologic malignancy.”** (I kontekst af de overordnede diagnostiske kriterier kan klonale cellepopulationer indikere tilstedeværelse af hæmatologisk malignitet.)
- 8.2.2. Tre eller flere signifikante toppe markeret af algoritme-regnearket inden for det gyldige størrelsesinterval rapporteres som: **“T cell receptor gamma chain gene rearrangements are consistent with the detection of biclonality or oligoclonality.”** (T-celle-receptor-gammakæde-gen-rearrangement(er) er konsistent med påvisning af biklonalitet eller oligoklonalitet).
- 8.2.3. Fravær af signifikante toppe markeret af algoritme-regnearket inden for det gyldige størrelsesinterval rapporteres som: **“Negative for the detection of clonal T cell receptor gamma chain gene rearrangement(s).”** (Negativ for påvisning af klonale T-celle-receptor-gammakæde-gen-rearrangement(er).)

**Bemærk:** Foretag en visuel bekræftelse for at bekræfte, at elektroferogrammet og algoritmen stemmer overens.

## 9. Procedurens begrænsninger

- Denne analyse identificerer ikke 100% af klonale cellepopulationer.
- Analysen kan ikke med sikkerhed påvise færre end 5 positive celler pr. 100 totale celler.
- Resultaterne af molekulære klonalitetstests skal altid fortolkes i sammenhæng med kliniske, histologiske og immunfænotypiske data.
- Algoritmen kræver en rimelig konsistent signalbaggrund, samt at data er angivet korrekt. Huller i baggrunden kan betyde, at algoritmen bestemmer en prøve forkert. Gennemse alle elektroferogrammer for at bekræfte validiteten af fortolkningen.
- PCR-baserede assays kan interfereres af forringelse af DNA'et eller hæmning af PCR-amplifikation forårsaget af EDTA, heparin eller andre stoffer.

## 10. Forventede værdier

### 10.1. Forventet størrelse på amplificerede produkter

De anførte amplikonstørrelser er blevet bestemt ud fra en ABI-platform. De amplikonstørrelser, der ses på dit specifikke kapillær elektroforese-instrument, kan variere med 1 til 4 nt i forhold til de anførte, afhængigt af den anvendte påvisningsplatform og analysesoftwareversion. Når amplikonstørrelsen først er identificeret og bestemt på din specifikke platform, vil den være konsekvent fra kørsel til kørsel. Denne reproducerbarhed er ekstrem nyttig i forbindelse med overvågning af tilbagevendende sygdom.

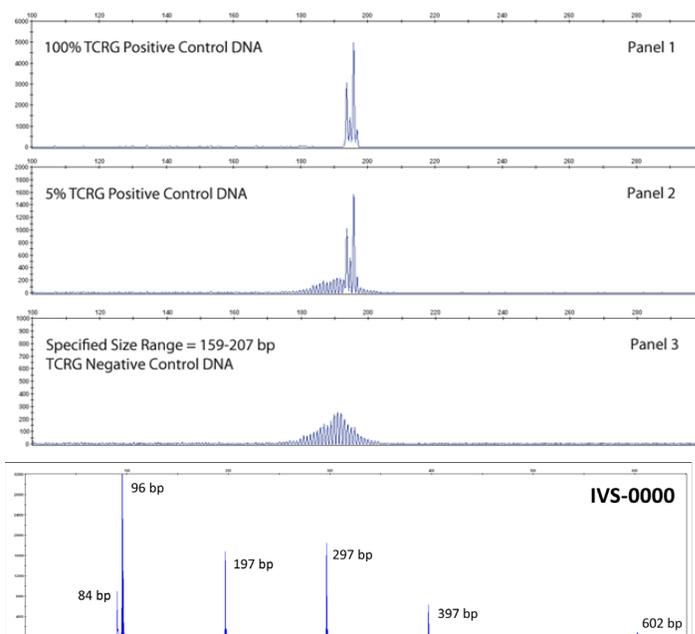
**Bemærk:** Farve angiver farven på produkter, der genereres med mastermixet ved anvendelse af standardfarvetildelingen på ABI-fluorescenspåvisningssystemer.

Tabel 8. Forventet størrelse på amplificerede produkter

Mastermix	Mål	Farve	Kontrol-DNA	Kat.nr.	Produkt-størrelse (nt)	Forventede algoritmeresultater
<b>TCRG-6FAM</b>	Alle V- og J-gener V $\gamma$ 9, V $\gamma$ 10 +	Blå Blå	<b>Angivet størrelsesinterval</b>	---	<b>159 - 207</b>	Ingen signifikante toppe Signifikant top ved 196 nt og mulig anden top ved 194 nt
			TCRG Negative Control DNA	40920020	159 - 207	
			5% TCRG Positive Control DNA	40883320	194, 196	
<b>Specimen Control Size Ladder</b>	Flere gener	Blå	Enhver form for humant DNA	---	96, 197, 297, 397, 602 <sup>a</sup>	N/A

<sup>a</sup>**Bemærk:** Da amplificeringen fortrinsvist foretages for mindre PCR-fragmenter, er det ikke usædvanligt, at 602 nt-fragmentet har et formindsket signal eller mangler helt. Ved ABI-fluorescenspåvisning kan det ske, at 602 nt-toppen ikke vises under normale kørselstider. Størrelsen af denne top kan desuden afvige med over 30 nt, når fragmentstørrelsen ekstrapoleres ved hjælp af GeneScan - 400HD [ROX]-størrelsesstandarder.

### 10.2. Prøvedata



Figur 2. Dataene blev genereret ved hjælp af TCRG-6FAM-mastermix. Amplificerede produkter blev kørt på et ABI-instrument.

Figur 3. Dataene blev genereret ved hjælp af Specimen Control Size Ladder-mastermix.

## 11. Karakteristika for ydeevnen

Analysen kunne påvise klonale rearrangementer i elleve (11) positive kontrolcellelinjer.

**Tabel 9.** Følgende velkarakteriserede T-celle-leukæmi-cellelinjer, der vides at være positive for *TCRG*-rearrangementer, blev testet med *TCRG* - 6FAM-mastermixet, og resultaterne er vist nedenfor. Der blev påvist to fremtrædende toppe for hver af cellelinjerne.

Cellelinje	IVS-kat.nummer	Top 1 (nt)	Top 2 (nt)
100% IVS-0004	4-088-0190	178,8	187,9
100% IVS-0005	4-088-0250	173,0	198,3
100% IVS-0008	4-088-0430	195,1	206,7
100% IVS-0009	4-088-0490	187,8	190,5
100% IVS-0016	4-088-0910	169,4	193,7
100% IVS-0021	4-088-1210	183,1	188,0
100% IVS-0039	4-088-2290	193,9	195,9
DND-41	N/A	168,9	188,8
PF-382	N/A	190,6	200,1
MOLT-13	N/A	187,9	190,6

**Tabel 10.** Analysen viste robuste resultater, når der blev testet med IVS-0039 DNA (200 ng/μL) fortyndet i tonsilt DNA (200 ng/μL) ved 5%, 10%, 25%, 50% og 75% (v/v).

		Top 1				Top 2			
		Produkt-størrelse (nt)	D(x)-værdi	RPR-forhold	Signifikant?	Produkt-størrelse (nt)	D(x)-værdi	RPR-forhold	Signifikant?
5% IVS-0039	rep 1	196,20	0,2330	6,04	Ja	194,16	0,1208	2,93	Nej
	rep 2	195,81	0,1803	5,32	Ja	193,75	0,0993	2,65	Nej
	rep 3	195,71	0,1872	6,68	Ja	193,65	0,0962	2,45	Nej
	rep 4	196,18	0,2080	6,34	Ja	194,09	0,0941	2,88	Nej
	rep 5	195,79	0,1833	6,07	Ja	193,77	0,0931	2,70	Nej
10% IVS-0039	rep 1	196,24	0,3573	9,76	Ja	194,31	0,2115	5,15	Ja
	rep 2	196,15	0,3382	9,18	Ja	193,95	0,1877	4,03	Ja
	rep 3	195,66	0,2790	8,32	Ja	193,62	0,1819	4,24	Ja
	rep 4	196,15	0,3382	9,18	Ja	193,95	0,1877	4,03	Ja
	rep 5	195,80	0,2983	7,77	Ja	193,75	0,1830	4,69	Ja
25% IVS-0039	rep 1	196,02	0,3947	8,00	Ja	194,16	0,3730	22,2	Ja
	rep 2	196,11	0,3216	6,07	Ja	194,17	0,3568	20,09	Ja
	rep 3	195,72	0,4059	9,39	Ja	193,66	0,3451	17,02	Ja
	rep 4	196,11	0,3212	6,07	Ja	194,17	0,3561	20,09	Ja
	rep 5	195,71	0,4316	10,24	Ja	193,65	0,3482	17,09	Ja
50% IVS-0039	rep 1	196,15	0,2939	4,58	Ja	194,23	0,4545	630,3	Ja
	rep 2	195,67	0,3817	7,31	Ja	193,69	0,4686	120,4	Ja
	rep 3	195,66	0,4503	9,17	Ja	193,62	0,4672	28,15	Ja
	rep 4	196,07	0,3586	5,73	Ja	194,11	0,4607	32,59	Ja
	rep 5	195,67	0,4404	8,85	Ja	193,69	0,4626	124,4	Ja
75% IVS-0039	rep 1	196,11	0,2387	3,36	Nej	193,89	0,3532	58,40	Ja
	rep 2	195,72	0,3154	5,29	Ja	193,66	0,4799	71,81	Ja
	rep 3	195,62	0,4520	9,16	Ja	193,57	0,4811	110,9	Ja
	rep 4	196,15	0,2911	4,45	Ja	194,14	0,4387	79,15	Ja
	rep 5	195,71	0,3301	5,86	Ja	193,65	0,4708	78,47	Ja

**Tabel 11.** Når analysen blev udført i kombination med *TCRG*-algoritme-regnearket kunne den påvise DNA fra 6 kontrolcellelinjer (200 ng/μL) fortyndet i tonsilt DNA (200 ng/μL) ved 5% (v/v). Resultaterne vises nedenfor.

	Top 1	Top 2
--	-------	-------

		Produkt-størrelse (nt)	D(x)	RPR-forhold	Signifikant?	Produkt-størrelse (nt)	D(x)	RPR-forhold	Signifikant?
5% IVS-0004	rep 1	178,87	0,2964	42,50	Ja	184,69	0,1322	5,61	Ja
	rep 2	184,36	0,1193	27,59	Ja	178,39	0,0908	21,13	Ja
	rep 3	184,32	0,1266	22,96	Ja	178,32	0,1041	23,93	Ja
	rep 4	184,69	0,1200	14,97	Ja	178,78	0,1009	29,82	Ja
	rep 5	184,36	0,1342	12,12	Ja	178,40	0,1146	32,07	Ja
5% IVS-0016	rep 1	169,38	0,1035	115,9	Ja	193,71	0,1016	2,32	Nej
	rep 2	169,03	0,0918	159,0	Ja	193,50	0,0857	2,24	Nej
	rep 3	168,99	0,0975	55,00	Ja	193,41	0,0791	2,25	Nej
	rep 4	169,38	0,1028	100,9	Ja	193,77	0,1041	2,45	Nej
	rep 5	169,00	0,0957	55,0	Ja	193,53	0,0944	2,50	Nej
5% IVS-0021	rep 1	187,91	0,1120	7,28	Ja	182,92	0,1239	14,57	Ja
	rep 2	187,58	0,1003	5,67	Ja	182,53	0,1298	14,23	Ja
	rep 3	182,50	0,0950	35,5	Ja	187,50	0,1110	5,54	Ja
	rep 4	187,92	0,1112	6,99	Ja	183,01	0,1238	12,68	Ja
	rep 5	187,62	0,0978	6,09	Ja	182,67	0,1253	24,69	Ja
5% IVS-0039	rep 1	195,97	0,2907	8,46	Ja	193,95	0,1576	3,60	Nej
	rep 2	195,70	0,2221	6,74	Ja	193,59	0,1321	3,04	Nej
	rep 3	195,56	0,2010	6,86	Ja	193,53	0,1244	2,84	Nej
	rep 4	196,01	0,2942	8,05	Ja	194,01	0,1484	3,18	Nej
	rep 5	195,71	0,2513	7,53	Ja	193,65	0,1470	3,36	Nej
5% PF-382	rep 1	191,84	0,2784	5,77	Ja	158,41	0,3057	123,5	Ja
	rep 2	191,48	0,2558	5,30	Ja	158,24	0,2739	125,7	Ja
	rep 3	191,57	0,2418	5,44	Ja	158,15	0,2787	115,1	Ja
	rep 4	191,84	0,2822	5,68	Ja	158,33	0,2811	118,8	Ja
	rep 5	191,55	0,2524	5,63	Ja	158,15	0,2883	93,0	Ja
5% MOLT-13	rep 1	190,74	0,2147	3,97	Nej	187,92	0,1292	6,96	Ja
	rep 2	190,46	0,1806	3,51	Nej	187,60	0,1081	4,96	Ja
	rep 3	190,46	0,1731	3,42	Nej	187,53	0,1039	5,27	Ja
	rep 4	190,64	0,2132	4,10	Ja	187,93	0,1215	5,69	Ja
	rep 5	190,46	0,1983	6,19	Ja	187,57	0,1114	5,80	Ja

Bemærk: 5% IVS-0004 er [REF](#) 40880230, 5% IVS-0016 er [REF](#) 40880950, 5% IVS-0021 er [REF](#) 40881250 og 5% IVS-0039 er [REF](#) 40882330.

Der blev brugt kliniske prøver til sammenligning af *TCRG* V2-analyseresultater med Roche 454-sekventering til identifikation af T-celle-receptor-gamma-gen-rearrangementer. For 454-sekventeringen blev enhver DNA-sekvens, der fandtes med niveauer højere end 5% af de samlede sekvenser, betragtet som en klonal hændelse. Hvis mere end to (2) sekvenser oversteg grænsen på 5%, blev den pågældende prøve defineret som oligoklonal. *TCRG* V2-analysen havde 100% konkordans for de syv (7) prøver, der blev identificeret som klonale ved sekventering. Der var 75% konkordans for de tolv (12) prøver, der enten var negative for en klonal hændelse eller var oligoklonale. Prøvetyperne var bl.a. perifert blod, knoglemarv og FFPE-prøver. Det er vigtigt at bemærke, at tilstedeværelse eller fravær af klonale toppe i en klinisk prøve ikke altid korrelerer med de faktiske kliniske resultater.

## 12. Teknisk assistance og kundeservice

Vores tekniske personale og kundeservicepersonale står til rådighed mandag til fredag og besvarer henvendelser via telefon, e-mail eller vores hjemmeside.

### Kontaktinformationer



Inivoscribe, Inc

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | USA

Telefon: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Ekspeditionstider: 7:00AM - 5:00PM PST/PDT

Teknisk service: [support@inivoscribe.com](mailto:support@inivoscribe.com) | Kundeservice: [sales@inivoscribe.com](mailto:sales@inivoscribe.com) | Websted: [www.inivoscribe.com](http://www.inivoscribe.com)

## 13. Referencer

1. Miller, JE, et al., An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Molecular Diagnostics*. 1999, 4(2):101-117. [https://doi.org/10.1016/S1084-8592\(99\)80035-6](https://doi.org/10.1016/S1084-8592(99)80035-6)
2. Armand, M, et al., A New and Simple TRG Multiplex PCR Assay for Assessment of T-cell Clonality: A Comparative Study from the EuroClonality Consortium. *HemaSphere*, 2019;3:3. <http://dx.doi.org/10.1097/>

## 14. Symboler

Følgende symboler anvendes ved mærkning af produkter fra Invivoscribe.

	Katalognummer		Udløbsdato
	Reagensvolumen		Autoriseret Repræsentant i EU
	Lotnummer		Se brugsanvisning
	Opbevaringsbetingelser		<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Unik Enheds-Id		Fabrikant
	UK Overensstemmelse Vurderet		Ansvarlig person i Storbritannien
	Autoriseret Schweizisk Repræsentant		Europæisk Overensstemmelse

## 15. Juridisk meddelelse

### 15.1. Garanti og ansvar

Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) bestræber sig på at levere produkter af den højeste kvalitet. Invivoscribe® garanterer, at deres produkter opfylder eller overgår de standarder for ydeevne, der er beskrevet i brugsanvisningen, hvor det drejer sig om produkter med en sådan indlægseddél. Hvis et produkt er omfattet af produktspecifikationer, og produktets ydeevne viser sig ikke at være som angivet, er det vores politik at erstatte produktet med et andet eller kreditere kunden den fulde købspris. Invivoscribe® giver ingen andre garantier, hverken udtrykkelige eller underforståede. Invivoscribe®'s erstatningsansvar kan ikke være højere end produktets købspris. Invivoscribe er ikke ansvarlig for direkte eller indirekte skader, hændelige skader eller følgeskader, der opstår som følge af brugen, resultater af brugen eller manglende evne til at bruge produkterne; produktets effektivitet under køberkontrollerede forhold i købers laboratorium skal fastlægges og løbende monitoreres gennem køberdefinerede og -kontrollerede processer, herunder, men ikke begrænset til, test af positive, negative og blinde kontroller, hver gang en prøve testes. Bestilling, modtagelse og brug af produktet udgør købers accept af eneansvar for at sikre produktets effektivitet og købers accept af den ansvarsbegrænsning, der er anført i dette afsnit.

Dette produkt er et *in vitro*-diagnostisk produkt, der ikke må sælges eller anvendes i Nordamerika.

### 15.2. Patenter og varemærker

Dette produkt er omfattet af et eller flere af følgende: europæisk patentnummer 1549764, europæisk patentnummer 2418287, europæisk patentnummer 2460889, japansk patentnummer 4708029, US-patent 8859748 og relaterede aktuelle og fremtidige patentansøgninger. Alle disse patenter og ansøgninger er licenseret eksklusivt til Invivoscribe®. Yderligere patenter licenseret til Invivoscribe, der omfatter visse af disse produkter, gælder andre steder. Mange af disse produkter kræver brug af metoder til nukleinsyreamplifikation, f.eks. polymerasekædereaktion (PCR). Der overdrages ingen licens under disse patenter til brug af amplifikationsprocesser eller enzymer, hverken udtrykkeligt eller stiltiende, til køber med købet af dette produkt.

Identiclone® er et registreret varemærke fra Invivoscribe®

©2023 Invivoscribe, Inc. Alle rettigheder forbeholdes. De varemærker, der er nævnt i dette dokument, tilhører Invivoscribe, Inc. og/eller virksomhedens affilerede selskaber eller (med hensyn til andres varemærker brugt heri) deres respektive ejere.