

Brugsanvisning

CE UK IVD

IdentiClone® *IGH* Gene Clonality Assay

Til identifikation af klonale immunglobulin-tungkæde-gen-rearrangementer.

IVD 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)

Katalognr.	Produkter	Antal
REF 91010061	IdentiClone <i>IGH</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 reaktioner
REF 91010081	IdentiClone <i>IGH</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 reaktioner

Indholdsfortegnelse

1.	TILSIGTET ANVENDELSE.....	3
2.	INFORMATION OM OG FORKLARING AF TESTEN	3
2.1.	Baggrund	3
2.2.	Sammendrag.....	3
3.	TESTPRINCIP	4
3.1.	Polymerasekædereaktion (PCR).....	4
3.2.	Differentialfluorescenspåvisning	4
4.	REAGENSER.....	5
4.1.	Reagenskomponenter	5
4.2.	Advarsler og forholdsregler	6
4.3.	Opbevaring og håndtering	6
5.	INSTRUMENTER	7
5.1.	Termocykler	7
5.2.	ABI-kapillær elektroforese-instrumenter.....	7
6.	INDSAMLING OG KLARGØRING AF PRØVEMATERIALE.....	8
6.1.	Forholdsregler	8
6.2.	Interfererende stoffer	8
6.3.	Krav til prøvemateriale samt håndtering.....	8
6.4.	Klargøring af prøve	8
6.5.	Prøveopbevaring	8
7.	ANALYSEPROCEDURE	9
7.1.	Medfølgende materialer.....	9
7.2.	Nødvendige materialer (der ikke medfølger).....	9
7.3.	Klargøring af reagenser	10
7.4.	Amplifikation.....	11
7.5.	ABI-fluorescenspåvisning	11
7.6.	Kvalitetskontrol	12
7.7.	Anbefalede positive kontroller	13
8.	FORTOLKNING AF RESULTATER.....	13
8.1.	Analyse.....	13
8.2.	Fortolkning af prøver	14
9.	PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER	14
10.	FORVENTEDE VÆRDIER	15
10.1.	Forventet størrelse på amplificerede produkter	15
10.2.	Prøvedata.....	16
11.	KARAKTERISTIKA FOR YDEEVNEN	18
12.	REFERENCER.....	18
13.	TEKNISK ASSISTANCE OG KUNDESERVICE.....	18
14.	SYMBOLER	19
15.	JURIDISK MEDDELELSE	19
15.1.	Garanti og ansvar	19
15.2.	Patenter og varemærker	19

1. Tilsigtet anvendelse

IdentiClone *IGH* Gene Clonality Assay er et *in vitro*-diagnostisk produkt, der er beregnet til PCR-baseret påvisning af klonale immunglobulin-tungkæde-gen-rearrangementer hos patienter med mulige lymfeproliferationer. *IGH* Gene Clonality Assay kan specifikt anvendes til at:

- identificere klonalitet i atypiske lymfeproliferative lidelser
- understøtte differentialdiagnosticering af reaktive læsioner og hæmatologiske maligniteter⁴
- bestemme formodet afstamning ved modne monoklonale lymfeproliferative lidelser
- identificere tumorspecifikke markører (*IGH* gen-rearrangementer) til monitorering efter behandling
- monitorere og evaluere mulig tilbagevendende sygdom

2. Information om og forklaring af testen

2.1. Baggrund

Rearrangement af antigen-receptor-generne forekommer under ontogenese i B- og T-lymfocytter. Disse gen-rearrangementer genererer produkter, der er unikke i deres længde og sekvens. Polymerasekædereaktion (PCR)-analyser kan derfor 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.¹ Denne PCR-analyse anvender flere konsensus-DNA-primere, der er rettet mod de konserverede genetiske områder inden for immunglobulin-tungkæde-genet. Denne test anvendes til at påvise størstedelen af klonale B-celle-maligniteter i DNA. Testprodukterne kan analyseres ved hjælp af en række forskellige påvisningsmetoder, bl.a. gel- og kapillær elektroforese.

Invivoscribes IdentiClone-analyser repræsenterer en ny vinkel, når det drejer sig om PCR-baseret klonalitetstestning. Disse standardiserede analyser er blevet omhyggeligt optimeret ved at teste positive og negative kontrolprøver ved hjælp af multiplex-mastermix. Efter udviklingen af analyserne blev de valideret grundigt, herunder foretog man også test af mere end 400 kliniske prøver ved brug af REAL-klassifikation (Revised European/American Lymphoma Classification). Der blev udført tests på mere end tredive fremtrædende uafhængige testcentre rundt om i Europa i et undersøgelsessamarbejde kendt som BIOMED-2 Concerted Action.²

De ABI-påvisningsbaserede analyser kan ikke med sikkerhed påvise klonale populationer, der omfatter mindre end 1% af den totale lymfocytcellepopulation. Resultaterne af molekylære klonalitetstests skal altid fortolkes i sammenhæng med kliniske, histologiske og immunfænotypiske data.

2.2. Sammendrag

Dette testkit indeholder seks (6) mastermix. *IGH*-rør A, B og C mastermixene er rettet mod hhv. strukturområde 1, 2 og 3 inden for det variable område og joining-området i immunglobulin-tungkæde-locuset. *IGH*-rør D og E mastermixene er rettet mod diversitets- og joining-områderne. Endelig er Specimen Control Size Ladder-mastermixet rettet mod flere gener og genererer en serie amplikoner på 96, 197, 297, 397 og 602 basepar (bp) for at sikre, at kvaliteten og kvantiteten af DNA er tilstrækkelig for at kunne give et gyldigt resultat. Et enkelt termocyklerprogram og tilsvarende påvisningsmetodologier anvendes med alle Invivoscribe-genklonalitetsanalyser. Dette forbedrer ensartetheden og gør det nemmere at krydstræne på et bredt udvalg af forskellige analyser.

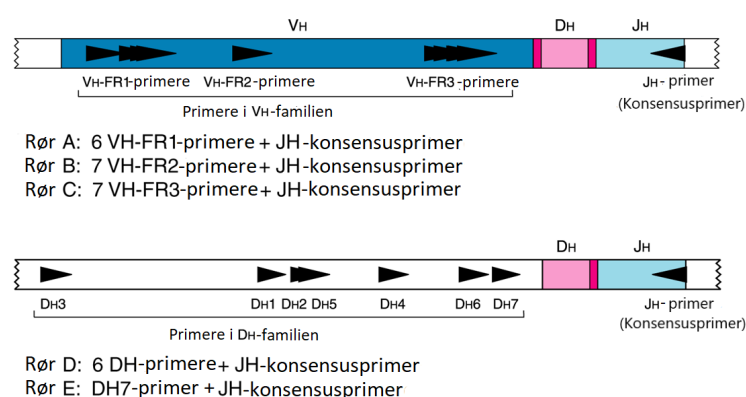
Denne analyse er baseret på EuroClonality/BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.



3. Testprincip

3.1. Polymerasekædereaktion (PCR)

PCR-analyser anvendes rutinemæssigt til identifikation af klonale B-cellepopulationer. Disse tests amplificerer DNA'et mellem primere, der er rettet mod det konserverede strukturområde (FR) for de variable (V) områder og de konserverede joining (J)-områder (*IGH*-rør A, B og C) samt diversitets- (D) og joining-områderne (*IGH*-rør D og E). 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 immunglobulin-tungkæde 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 DNA-primere, der ligger op til V-J-området, blive skabt en klokkeformet kurve (gaussisk fordeling) af amplikon-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 ses et produkt.) DNA fra prøver, der indeholder en klonal population, giver et eller to fremtrædende amplificerede produkter (amplikoner) inden for en formindsket polyklonal baggrund.



Figur 1. På figuren ses en forenklet gengivelse af et rearrangeret immunglobulin-tungkæde-gen på kromosom 14. De sorte pile repræsenterer de relative positioner for primere, der er målrettet de konserverede strukturområde (FR1-3) og diversitetsområder (D_H1-7) samt downstream-konsensus J_H gen-segmenter. De amplikonprodukter, der genereres fra hvert af områderne, kan differentialpåvises, når der benyttes fluorescerende primersæt med instrumenter til kapillær elektroforese, der anvender differentialfluorescenspåvisning.

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-primerssekvenser til at være målrettet alle de konserverede omgivelser omkring V-J-rearrangementet. N-området diversitet og somatisk mutation forstyrrer DNA-sekvenserne i disse områder yderligere. Derfor er der brug for multiplex-mastermix, der er rettet mod flere FR-områder, til at identificere størstedelen af de klonale rearrangementer. Som angivet identificeres klonale rearrangementer som fremtrædende produkter af en enkelt størrelse på en baggrund af amplikonprodukter af forskellig størrelse, der danner en gaussisk fordeling rundt om et statistisk begunstiget rearrangement af gennemsnitlig størrelse. Bemærk, at de primere, der amplificerer de forskellige FR-områder, der findes i tre bestemte afsnit langs tungkæde-genet, producerer et tilsvarende interval for V-J-produkter i forskellige størrelser.

3.2. Differentialfluorescenspåvisning

Differentialfluorescenspåvisning anvendes ofte til at afklare amplikonprodukterne i forskellig størrelse ved hjælp af et kapillært elektroforese-instrument. Primere kan konjugeres med flere forskellige fluorescerende farvestoffer (fluoroforer), så de kan producere forskellige emissionsspektre ved excitation med laser i det kapillære elektroforese-instrument. På denne måde kan forskellige fluorescerende farvestoffer svare til forskellige target-områder. Dette påvisningssystem resulterer i uovertruffen sensitivitet, afklaring af enkelt nukleotider, differentialprodukt påvisning og relativ kvantifikation. Derudover kan brug af agarose- og polyakrylamid-gel samt brug af karcinogener som f.eks. ethidiumbromid stort set elimineres. Differentialpåvisning giver desuden mulighed for nøjagtig, reproducerbar og objektiv fortolkning af primerspecifikke produkter og automatisk arkivering af data. 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.

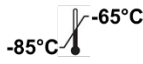
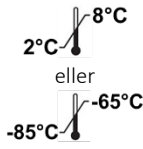
4. Reagenser

4.1. Reagenskomponenter

Tabel 1. Tilgængelige kits

Katalognummer	Beskrivelse	Mængde
REF 91010061	IdentiClone <i>IGH</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 reaktioner
REF 91010081	IdentiClone <i>IGH</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 reaktioner

Tabel 2. Kittets komponenter

Reagens	Katalognummer	Reagenskomponenter (aktive ingredienser)	Enheds-mængde	91010061 Antal enheder	91010081 Antal enheder	Opbevarings-temp.
Mastermix	21010011CE	<i>IGH</i>-rør A – 6FAM Flere oligonukleotider, der er målrettet struktur 1-området i immunglobulin-tungkæde-genet i en bufferet saltopløsning.	1500 µL	1	10	 -65°C
	21010101CE	<i>IGH</i>-rør B – 6FAM Flere oligonukleotider, der er målrettet struktur 2-området i immunglobulin-tungkæde-genet i en bufferet saltopløsning.	1500 µL	1	10	
	21010031CE	<i>IGH</i>-rør C – HEX Flere oligonukleotider, der er målrettet struktur 3-området i immunglobulin-tungkæde-genet i en bufferet saltopløsning.	1500 µL	1	10	
	21010041CE	<i>IGH</i>-rør D – HEX Flere oligonukleotider, der er målrettet diversitets- og joining-områderne i immunglobulin-tungkæde-genet i en bufferet saltopløsning.	1500 µL	1	10	
	21010051CE	<i>IGH</i>-rør E – 6FAM Flere oligonukleotider, der er målrettet diversitets- og joining-områderne i immunglobulin-tungkæde-genet i en bufferet saltopløsning.	1500 µL	1	10	
Template Amplification Control Master Mix	20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM Flere oligonukleotider rettet mod "housekeeping"-gener.	1500 µL	1	10	
Positiv kontrol-DNA'er	40881750	IVS-0030 Clonal Control DNA 200 µg/mL DNA i 1/10 TE-opløsning	100 µL	1	5	 2°C eller -85°C
	40881090	IVS-0019 Clonal Control DNA 200 µg/mL DNA i 1/10 TE-opløsning	100 µL	1	5	
	40881390	IVS-0024 Clonal Control DNA 200 µg/mL DNA i 1/10 TE-opløsning	100 µL	1	5	
	40880430	IVS-0008 Clonal Control DNA 200 µg/mL DNA i 1/10 TE-opløsning	100 µL	1	5	
Negativ (normal) kontrol-DNA	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA 200 µg/mL DNA i 1/10 TE-opløsning	100 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 vand af molekylærbiologisk kvalitet ved klargøring af prøve-DNA.
- Grundet denne tests 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.
- Autoklavering kan ikke eliminere DNA-kontaminering. Sørg for en envejsarbejdsgang 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 og -65°C.
- Den optimale opbevaringstemperatur for DNA-kontroller er 2°C til 8°C, men det er muligt at opbevare DNA-kontroller ved -85°C til -65°C.
- Alle reagenser og kontroller skal optøs og vortex-mixes eller blandes grundigt før brug for at sikre, at de er fuldstændigt resuspenderede. Overdreven vortex-mixning kan ødelægge DNA'et og 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.
- På grund af høje saltkoncentrationer er PCR-mastermix sensitive over for gentagne nedfrysninger og optøninger. Udpipetter eventuelt mastermixene i sterile glas med o-ring-skruelåg, hvis det er nødvendigt.

5. Instrumenter

5.1. Termocykler

- Brug eller funktion: Amplifikation af DNA-prøver
- Foreslået instrument: Veriti™-termocykler eller tilsvarende
- 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 310 Genetic Analyzer (1 kapillær)
 - 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 3500 Genetic Analyzer (8 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.
- Læs mere om prøveklargøring i afsnit 7.5 *ABI-fluorescenspåvisning*.

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 (ikke væsentligt ved lave koncentrationer)
- Heparin

6.3. Krav til prøvemateriale samt håndtering

Denne analyse bruges til test af **genomisk DNA** fra følgende kilder:

- 5 cc perifert blod, knoglemarvsbiopsi eller knoglemarvsaspirat antikoaguleret med heparin eller EDTA (opbevaret ved 2°C til 8°C og transporteret ved omgivelsestemperatur)
- En vævsblok på minimum 5 mm (opbevaret og transporteret i frossen tilstand eller opbevaret og transporteret i RPMI 1640 ved omgivelsestemperatur eller på is)
- 3 µg genomisk DNA (opbevaret ved 2°C til 8°C og transporteret ved omgivelsestemperatur)
- Formalin-fikseret paraffinindstøbt væv eller slide (opbevaret og transporteret ved omgivelsestemperatur)

6.4. Klargøring af prøve

Ekstraher hurtigst muligt det genomiske DNA fra patientprøverne. Resuspender DNA til en slutkoncentration på 100 µg til 400 µg pr. mL i 1/10 TE (1 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) eller i vand af molekylærbiologisk 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 ved -85°C til -65°C indtil brug.

7. Analyseprocedure

7.1. Medfølgende materialer

Tabel 3. Kittets komponenter

Katalognummer	Beskrivelse
21010011CE	IGH-rør A – 6FAM
21010101CE	IGH-rør B – 6FAM
21010031CE	IGH-rør C – HEX
21010041CE	IGH-rør D – HEX
21010051CE	IGH-rør E – 6FAM
20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM
40881750	IVS-0030 Clonal Control DNA
40881090	IVS-0019 Clonal Control DNA
40881390	IVS-0024 Clonal Control DNA
40880430	IVS-0008 Clonal Control DNA
40920010	IVS-0000 Polyclonal 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: - EagleTaq DNA Polymerase Invivoscribe, Inc.: - FalconTaq DNA Polymerase eller tilsvarende	05206944190 60970130	N/A
Glasdestilleret deioniseret vand af molekylærbiologisk kvalitet eller USP-vand	N/A	N/A	Sterilt og fri for DNase og RNase.
Kalibrerede pipetter	Rainin: - P-2, P-20, P-200 og P-1000 pipetter - Eller SL-2, SL-20, SL-200 og SL-1000 pipetter	N/A	Skal kunne afmåle volumener mellem 1 µL og 1000 µL nøjagtigt.
Termocykler	Thermo Fisher Scientific: - Veriti Dx Thermal Cycler Bio-Rad: - MJ Research PTC-100 eller PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer - PE 9600 eller PE 9700	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
ABI-kapillær elektroforese-instrument	Applied Biosystems: ABI 310-, 3100- eller 3500-serien	N/A	N/A
Hi-Di Formamid	Applied Biosystems: Hi-Di™ formamid	4311320	N/A
Størrelsesstandarder	Invivoscribe: - Hi-Di formamid m/ROX-størrelsesstandarder til ABI 3100 Applied Biosystems: - Til ABI 3100- eller 3130-instrumenter: - GeneScan™ - 400HD [ROX]™ - Til ABI 3500-instrumenter: - GeneScan - 600 [LIZ]™ v2.0	60980061 402985 4408399	N/A

Tabel 4. Nødvendige materialer (der ikke medfølger)

Reagens/materiale	Anbefalede reagenser/materialer og leverandører	Katalognummer	Bemærkninger
Farvesæt til spektral kalibrering	Applied Biosystems:		
	• Til ABI 3100- og 3130-instrumenter:		
	○ DS-30 matrixstandardkit (farvesæt D)	4345827	
	• Til ABI 310-instrumenter:		
	○ NED matrixstandard	402996	N/A
	○ Og fluorescerende amidit-matrixstandarder [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX]	401546	
	• Til ABI 3500-instrumenter:		
	○ DS-33 matrix-standardkit (farvesæt G5)	4345833	
Polymer	Applied Biosystems:		
	• POP-4 TM -polymer:		
	○ POP-4 til 310 Genetic Analyzers	402838	
	○ POP-4 til 3100/3100-Avant Genetic Analyzers	4316355	
	○ POP-4 til 3130/3130xL Genetic Analyzers	4352755	N/A
	• POP-7 TM -polymer:		
	○ POP-7 til 3130/3130xL Genetic Analyzers	4352759	
	○ POP-7 til 3500/3500xL Genetic Analyzers	4393714	
Buffer	Applied Biosystems:		
	• 10X buffer med EDTA til Genetic Analyzer	402824	Fortyndes i forholdet 1:10 i sterilt vand før brug

7.3. Klargøring af reagenser

- Alle ukendte prøver bør testes med Specimen Control Size Ladder-mastermix. Dette gøres 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.
- Testresultater fra enkeltbestemmelse er gyldige, men det anbefales at teste med **dobbeltbestemmelse**, når det er muligt. Hvis dobbeltbestemmelsen giver inkonsekvente resultater, må prøven gentestes eller reevalueres.
- Test **positive**, **negative** og **no-template**-kontroller for hvert mastermix.
- Det anbefales at samle flere prøver i én batchkørsel for at undgå at løbe tør for negativ kontrol (IVS-0000 Polyclonal Control DNA). Hvis batchkørsel af prøver ikke er praktisk i det pågældende laboratoriemiljø, er det også muligt at købe IVS-0000 Polyclonal Control DNA separat.

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

7.3.2. I en LAF-bænk eller lignende afpipetteres en passende mængde fra hvert mastermix til individuelle, rene og sterile mikrocentrifugerør.

- Afmål volumenerne = 45 µL for hver reaktion.
- Tilføj en ekstra reaktion for hver 15 reaktioner for at korrigere for pipetteringsfejl.
- For hvert mastermix (med undtagelse af Specimen Control Size Ladder) er antal reaktioner (**n**) således:

n = 2 × antal prøver	(kør hver prøve i dobbeltbestemmelse)
+ 1	positiv kontrol-DNA (se afsnit 7.7 <i>Anbefalede positive kontroller</i>)
+ 1	negativ kontrol-DNA (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	No Template-kontrol (NTC) (vand)
+ 1	til korrigering af pipetteringsfejl

$$n = 2 \times \text{antal prøver} + 4$$

I alt

- Derfor er den totale afmålingsvolumen for hvert mastermix = **n × 45 µL**.
- For Specimen Control Size Ladder-mastermix vil antallet af reaktioner (**m**) være:

m = antal prøver	(kør hver prøve i dobbeltbestemmelse)
+ 1	positiv kontrol-DNA (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	No Template-kontrol (NTC) (vand)
+ 1	til korrigering af pipetteringsfejl

$$m = \text{antal prøver} + 3$$

I alt

- Derfor er den totale afmålingsvolumen for Specimen Control Size Ladder-mastermix = **m × 45 µL**.

- 7.3.3. Tilsæt 1,25 U (eller 0,25 µL ved 5 U/µL) Taq DNA polymerase pr. reaktion til hvert mastermix.
- Total Taq DNA polymerase, der tilsættes hvert mastermix = $n \times 0,25 \mu\text{L}$, og $m \times 0,25 \mu\text{L}$ for 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.
- Pipettér 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 termocycler.
 - Hvis der ikke kan foretages amplificering umiddelbart efter reagensklargøring, kan PCR-pladen eller rørene opbevares ved 2°C til 8°C i op til 24 timer.

Lynguide:For hvert mastermix og n reaktioner blandes:

$n \times 45 \mu\text{L}$ mastermix
 $n \times 0,25 \mu\text{L}$ 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 ved BioRad MJ Research PTC-termocyklere.

Tabel 5: Indstillinger for termocykler

Trin	Temperatur	Varighed	Cykklusser
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-platformene. 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 har en forudgående top, der vises ved 84 nukleotider.
- Multiplex ikke PCR-produkter fra forskellige mastermix, da dette vil resultere i en generel reduceret sensitivitet for analysen.

ABI 310-, 3100- ELLER 3130-platforme

- 7.5.1. I et nyt mikrocentrifugerør blandes en passende mængde (til en samlet mængde på 10 µL pr. reaktion) Hi-Di formamid med ROX-størrelsesstandarde. Vortex-mix godt.
- 7.5.2. I en ny 96-brønds PCR-plade tilsættes 10 µL Hi-Di-formamid med ROX-størrelsesstandarde 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-størrelsesstandarde.
 - Tilsæt kun én prøve pr. brønd.
 - Pipetter op og ned for at blande.
- 7.5.4. Sæt låg på PCR-pladen eller -rørene eller dæk den/dem 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-kapillær elektroforese-instrument i henhold til brugermanualen.
 - 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 afsnit 10: *Forventede værdier nedenfor*).

ABI 3500-platforme

Bemærk: Da ydeevnen for ABI 3500-plattformen kan variere fra instrument til instrument, er den mængde formamid, antal prøver og størrelsesstandarde, der er angivet i protokollen, tænkt som et udgangspunkt. Det kan være nødvendigt at optimere protokollen til de specifikke ABI 3500-platforme.

- 7.5.9. I et nyt mikrocentrifugerør blandes en passende mængde (9,5 µL pr. reaktion) Hi-Di-formamid med LIZ-størrelsesstandarde. Vortex-mix godt.
- 7.5.10. I en ny 96-brønds PCR-plade tilsættes 9,5 µL Hi-Di-formamid med LIZ-størrelsesstandarde 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-størrelsesstandarde.
 - 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 afsnit 10: *Forventede værdier nedenfor*).

7.6. Kvalitetskontrol

Der medfølger positive og negative (eller normale) kontroller med kittet, der kan køres i enkeltbestemmelse, hver gang analysen udføres, for at sikre, at analysen fungerer korrekt. Der skal desuden anvendes en no template-kontrol (f.eks. vand) til at teste for eventuel kontaminering af mastermix eller krydskontaminering af PCR-reaktioner på grund af utilstrækkelig steril teknik. 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 amplificerede produkter*. Yderligere kontroller og sensitivitetskontroller (fortyndinger af positive kontroller i vores negative kontrol) kan fås fra Invivoscribe.

7.7. Anbefalede positive kontroller

De anførte amplikonstørrelser er blevet bestemt ud fra en ABI-plattform. De amplikonstørrelser, der ses 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. 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 6. Anbefalede positive kontroller

Mastermix	Mål	Farve	Kontrol-DNA	Katalognummer	Produktstørrelse i nukleotider (nt)
<i>IGH-rør A</i>	FR1-J _H	Blå	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 40881750	310 - 360 280 ^a , 325
<i>IGH-rør B</i>	FR2-J _H	Blå	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 40881750	250 - 295 260
<i>IGH-rør C</i>	FR3-J _H	Grøn	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0019 Clonal Control DNA	--- 40881090	100 - 170 145
<i>IGH-rør D</i>	D _H -J _H	Grøn	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0024 Clonal Control DNA	--- 40881390	110 - 290, 390 - 420 139
<i>IGH-rør E</i>	D _H 7-J _H	Blå	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0008 Clonal Control DNA	--- 40880430	100 - 130 ^b 109
Specimen Control Size Ladder	Flere gener	Blå	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	96, 197, 297, 397, 602 ^c 96, 197, 297, 397, 602 ^c

^aBemærk: En 280 nt-top kan også være til stede og er et kendt amplikon, der ligger lige uden for det gyldige størrelsesinterval for *IGH-rør A*.

^bBemærk: Et 209 nt PCR-produkt repræsenterer den mindste baggrundstop, der kommer fra kimcelle D_H7-J_H1-området. Når PCR-amplifikationen er meget effektiv, vil det også være muligt at opnå længere produkter, hvilket skyldes primer-binding (annealing) til downstream J_H gen-rearrangementer, f.eks. 416 nt (D_H7-J_H2), 1028 nt (D_H7-J_H3) osv.

^cBemærk: 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 hvert af mastermixene er blevet bestemt ud fra test af positive og negative kontrolprøver. For at sikre en nøjagtig og meningsfuld fortolkning er det vigtigt at ignorere toppe, der forekommer uden for det gyldige størrelsesinterval for hvert af mastermixene.

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 there was DNA of insufficient quantity or quality for analysis”** (Der kan ikke rapporteres et resultat for denne prøve, da der fandtes DNA af en kvantitet eller kvalitet, der ikke var tilstrækkelig til analyse).
- 8.1.2. Gentag test af prøver, hvor prøveresultatet var negativt, men den positive kontrol-reaktion mislykkedes.
- 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. Alle analysekontroller skal undersøges inden fortolkning af prøveresultater. Hvis kontrollerne ikke giver de korrekte resultater, er analysen ikke gyldig, og prøverne kan ikke fortolkes.

Tabel 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
NTC (No Template Control)	Ingen amplifikation til stede, fortsæt med analysen	Amplifikation til stede, gentag analysen.
Polyklonal kontrol	Produktstørrelsen svarer til den forventede størrelse som angivet i afsnit 10.1 <i>Forventet størrelse på amplificerede produkter</i> . Ingen klonale rearrangementer til stede. Fortsæt med analysen.	Klonale rearrangementer til stede. Gentag analysen.

Tabel 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
Positive Control (positiv kontrol) (Dette kan også fungere som en ekstraktionskontrol, hvis positivt kontrolmateriale gennemgår ekstraktionsprocesser)	Produktstørrelsen svarer til den forventede størrelse som angivet i afsnit 10.1 <i>Forventet størrelse på amplificerede produkter</i> . Fortsæt med analysen.	Gentag analysen.
Specimen Control Size Ladder (Denne amplifikationskontrol er <u>meget vigtig</u> for prøver af ukendt kvantitet og kvalitet.)	Hvis alle toppe ved 96, 197, 297, 397 og 602 nt ses, 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. Fortsæt med analysen.	Hvis der ikke ses nogen toppe, gentages analysen, <u>medmindre prøven (specimen control) testes positiv</u> . Hvis der kun ses 1, 2 eller 3 bånd, re-evalueres 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:

- En eller to af de fremtrædende positive toppe^a inden for det gyldige størrelsesinterval rapporteres som:
“Positive for the detection of clonal immunoglobulin heavy chain gene rearrangement(s) consistent with the presence of a clonal cell population.” (“Positive for påvisning af klonale immunoglobulin-tungkæde-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.)
- Fravær af positive toppe^a inden for det gyldige størrelsesinterval rapporteres som:
“Negative for the detection of clonal immunoglobulin heavy chain gene rearrangement(s).” (Negativ for påvisning af klonal immunoglobulin-tungkæde-gen-rearrangement(er).)

^a**Bemærk:** Kriterierne for at kunne definere en positiv top er følgende:

- Produkter genereret fra **diagnostiske prøver**, der ligger inden for det gyldige størrelsesinterval, og som er mindst tre gange amplituden af den tredjestørste top i den polyklonale baggrund, er ensbetydende med en positiv top.
- Produkter genereret fra **prøver opsamlet efter initialdiagnose**, der ligger inden for det gyldige størrelsesinterval og enten:
 - 1) er mindst tre gange amplituden af den tredjestørste top; **ELLER**,
 - 2) overstiger amplituden af de tilstødende nabotoppe og er identiske i størrelse med klonale amplikonprodukter tidligere genereret fra den samme patient ved brug af det samme mastermix, er ensbetydende med en positiv top.

9. Procedures begrænsninger

- Denne analyse identificerer ikke 100% af klonale cellepopulationer.
- Analysen kan ikke med sikkerhed påvise færre end 1 positiv celle pr. 100 normalceller.
- Resultaterne af molekulære klonalitetstests skal altid fortolkes i sammenhæng med kliniske, histologiske og immunfænotypiske data.
- 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 de enkelte kapillær elektroforese-instrumenter, 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 den enkelte 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	Katalognummer	Produktstørrelse i nt
<i>IGH-rør A</i>	FR1-J _H	Blå	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0030 Clonal Control DNA IVS-0019 Clonal Control DNA IVS-0024 Clonal Control DNA	--- 40920010 40881750 40881090 40881390	310 - 360 310 - 360 280 ^a , 325 345 342
<i>IGH-rør B</i>	FR2-J _H	Blå	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0030 Clonal Control DNA IVS-0019 Clonal Control DNA IVS-0024 Clonal Control DNA	--- 40920010 40881750 40881090 40881390	250 - 295 250 - 295 260 285 277
<i>IGH-rør C</i>	FR3-J _H	Grøn	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0019 Clonal Control DNA	--- 40920010 40881090	100 - 170 100 - 170 145
<i>IGH-rør D</i>	D _H -J _H	Grøn	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0030 Clonal Control DNA IVS-0019 Clonal Control DNA IVS-0024 Clonal Control DNA IVS-0008 Clonal Control DNA	--- 40920010 40881750 40881090 40881390 40880430	110 - 290, 390 - 420 235-258, 344 ^b --- ^c --- ^c 139 --- ^c
<i>IGH-rør E</i>	D _H 7-J _H	Blå	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0030 Clonal Control DNA IVS-0019 Clonal Control DNA IVS-0024 Clonal Control DNA IVS-0008 Clonal Control DNA	--- 40920010 40881750 40881090 40881390 40880430	100 - 130 209 ^d , 416 ^d --- ^e --- ^e --- ^e 109
Specimen Control Size Ladder	Flere gener	Blå	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	96, 197, 297, 397, 602^f 96, 197, 297, 397, 602 ^f

^aBemærk: En 280 nt-top kan også være til stede og er et kendt amplikon, der ligger lige uden for det gyldige størrelsesinterval for *IGH-rør A*.

^bBemærk: En ikke-specifik 344 nt top er resultatet af krydsbinding (cross-annealing) mellem D_H2 primeren og en sekvens i området upstream for J_H4. Denne top flytter sig ikke samtidig med D-J-produkter ved fragmentanalyse.

^cBemærk: Ikke-specifikke toppe på 74, 94, 158, 176, 187, 200 og 344 nt ses ved mange forskellige cellelinjer. Disse bånd er fraværende ved tilstedeværelse af polyklonale baggrunde.

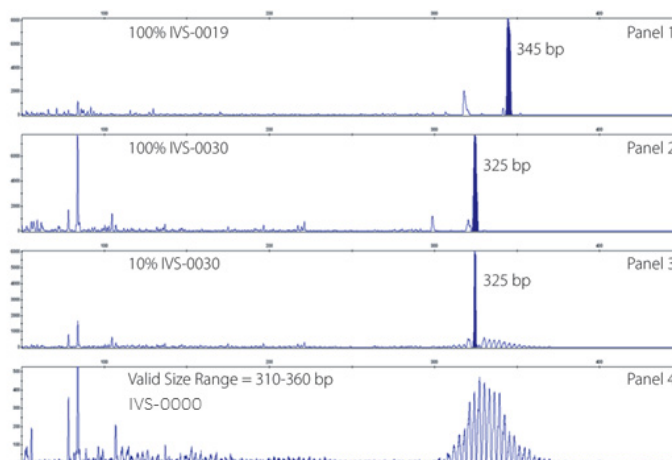
^dBemærk: Et 209 nt PCR-produkt repræsenterer den mindste baggrundstop, der kommer fra kimcelle D_H7-J_H1-området. Når PCR-amplifikationen er meget effektiv, vil det også være muligt at opnå længere produkter, hvilket skyldes primer-binding (annealing) til downstream J_H gen-rearrangementer, f.eks. 416 nt (D_H7-J_H2), 1028 nt (D_H7-J_H3) osv.

^eBemærk: Ikke-specifikke toppe på 79 og 123 nt ses ved mange forskellige cellelinjer. Disse bånd er fraværende ved tilstedeværelse af polyklonale baggrunde.

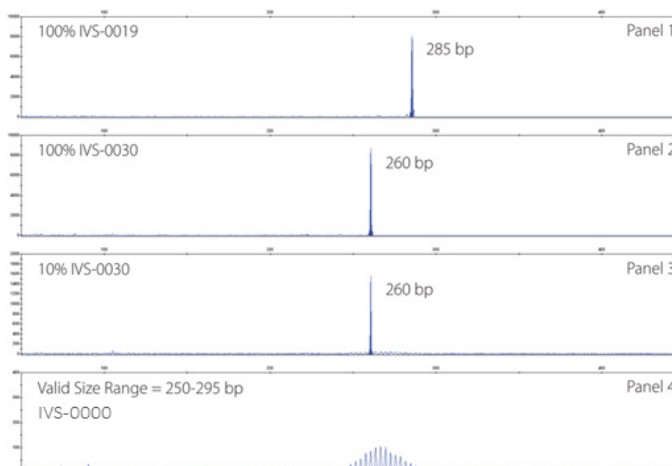
^fBemærk: Da amplificeringen fortrinsvist foretages for mindre PCR-fragmenter, er det ikke usædvanligt, at 602 nt-fragmentet har et formindsket signal eller mangler helt. Ved ABI-fluorescenspåvisning kan det ske, at 602 nt-toppen ikke vises under normale kørselstider. Størrelsen af denne top kan desuden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

10.2. Prøvedata

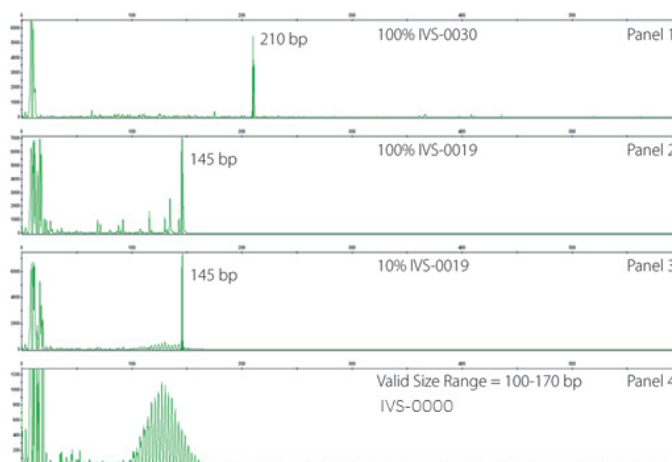
De data, der er vist nedenfor, er genereret ved hjælp af de angivne mastermix. Amplificerede produkter blev kørt på et ABI-instrument.



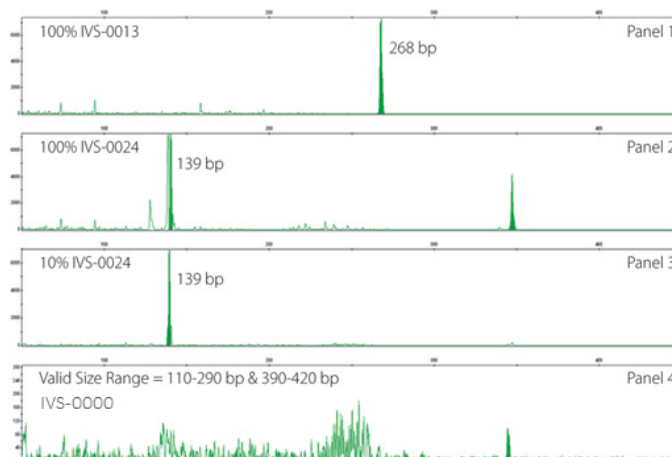
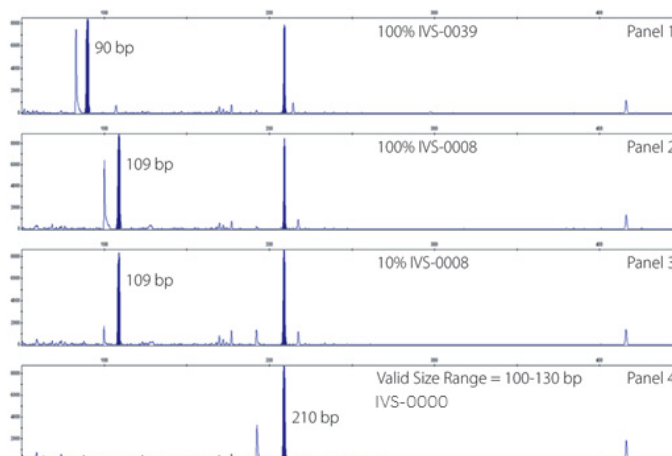
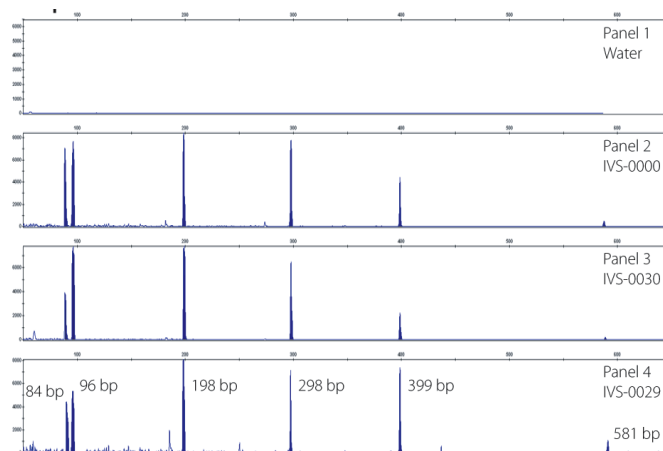
Figur 2. IGH-rør A



Figur 3. IGH-rør B



Figur 4. IGH-rør C

Figur 5. *IGH-rø D*Figur 6. *IGH-rø E*

Figur 7. Specimen Control Size Ladder-mastermix

11. Karakteristika for ydeevnen

Denne IdentiClone *IGH* Gene Clonality PCR-test er en hurtig og pålidelig procedure, der er langt mere sensitiv end Southern Blot (SB)-analyse, når det gælder om at påvise klonalitet i formodede lymfeproliferaioner. Den endelige kliniko-histopatologiske diagnose korrelerer godt med PCR-resultater hos et større antal patienter sammenlignet med SB-resultater, hvilket understøttes i to betydningsfulde artikler, der er nævnt nedenfor.^{2,3}

Tabel 9. Undersøgelser af overensstemmelse

PCR/SB-overensstemmelse: ²		PCR/SB-overensstemmelse: ³	
<i>IGH</i> :	93% sensitivitet/ 92% specificitet	<i>IGH + IGK</i> :	85% sensitivitet
<i>IGK</i> :	90% sensitivitet/ 90% specificitet		
<i>IGL</i> :	86% sensitivitet/ 92% specificitet		
<i>TCRB</i> :	86% sensitivitet/ 98% specificitet	<i>TCRB</i> :85% sensitivitet	
<i>TCRG</i> :	89% sensitivitet/ 94% specificitet		
<i>TCRD</i> :	83% sensitivitet/ 95% specificitet		

Tabel 10. PCR sammenlignet med SB-analyse i forhold til histopatologi og endelig diagnose

	PCR/SB-overensstemmelse:	PCR-sensitivitet:	SB-sensitivitet:
<i>IGH + IGK</i> :	85%	98%	39%
<i>TCRB</i> :	85%	96%	35%

En uafhængig undersøgelse udført af Sandberg *et al.* omfattede 300 patientprøver fra en række forskellige prøvetyper.³ I tilfælde, hvor der både blev udført PCR- og SB-analyser, og resultaterne kunne korreleres med histopatologi og en endelig diagnose, blev den diagnostiske nøjagtighed af udvalgte IdentiClone-tests bestemt til at være mindst 96%. Dette var langt mere nøjagtigt end SB-analyse, der i denne undersøgelse ikke fandt 23 tydelige tilfælde af malignitet og 7 mulige maligniteter. Der blev ikke genereret nogen tydelige falsk-positive resultater med IdentiClone-testene, og der var en høj grad af præcision.³ En klar fordel ved denne analyse var desuden, at de klonale resultater, der blev genereret, gav mulighed for efterfølgende påvisning af patient- og tumor-specifikke gen-rearrangementer til påvisning af minimal restsygdom (MRD).

12. Referencer

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

13. 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



Invivoscribe, 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@invivoscribe.com | Kundeservice: sales@invivoscribe.com | Websted: www.invivoscribe.com

14. Symboler

Følgende symboler anvendes nu ved mærkning af diagnostiske 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 indlægsseddel. 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 affilierede selskaber eller (med hensyn til andres varemærker brugt heri) deres respektive ejere.