

Brugsanvisning

CE UK
CA IVDIdentiClone® *TCRB* + *TCRG* T-Cell Clonality Assay

Til identifikation af klonale T-celle-receptor-betakæde- og gammakæde-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 92000011	IdentiClone <i>TCRB</i> + <i>TCRG</i> T-Cell Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 reaktioner
REF 92000021	IdentiClone <i>TCRB</i> + <i>TCRG</i> T-Cell Clonality 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.....	12
8.	FORTOLKNING AF RESULTATER.....	13
8.1.	Analyse.....	13
8.2.	Fortolkning af prøver.....	14
9.	PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER	14
10.	FORVENTEDE VÆRDIER	14
10.1.	Forventet størrelse på amplificerede produkter	14
10.2.	Prøvedata.....	15
11.	KARAKTERISTIKA FOR YDEEVNEN	16
12.	TEKNISK ASSISTANCE OG KUNDESERVICE	17
13.	REFERENCER	17
14.	SYMBOLER.....	17
15.	JURIDISK MEDDELELSE.....	18
15.1.	Garanti og ansvar	18
15.2.	Patenter og varemærker	18

1. Tilsigtet anvendelse

IdentiClone *TCRB* + *TCRG* T-Cell Clonality Assay er et *in vitro*-diagnostisk produkt, der er beregnet til PCR-baseret påvisning af klonale T-celle-receptor-betakæde- og gammakæde-gen-rearrangementer hos patienter med mulige lymfeproliferaioner. *TCRB* + *TCRG* T-Cell Clonality Assay kan specifikt anvendes til at:

- identificere klonalitet i mulige lymfeproliferaioner
- understøtte differentialdiagnosticering af reaktive læsioner samt T-celle- og visse umodne B-celle-maligniteter
- bestemme afstamning ved modne lymfeproliferative lidelser
- 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 IdentiClone PCR-analyse anvender flere konsensus-DNA-primere, der er målrettet de konserverede genetiske områder inden for T-celle-receptor-betakæde- og gammakæde-generne. Denne test anvendes til at påvise størstedelen af klonale T-celle-maligniteter i DNA. Testprodukterne kan analyseres ved hjælp af en række forskellige påvisningsmetoder, bl.a. gel- og kapillær elektroforese.

Der kan også foretages gen-rearrangementsanalyse ved hjælp af Southern Blot (SB)-baserede teknikker. Selvom SB-analyse er meget pålidelig, erstattes den i stigende grad af PCR-teknikker, da PCR er mere effektivt og sensitivt. Derudover er PCR forholdsvis enkel, mindre arbejdskrævende og kræver langt mindre mængder af højmolekylært (HMW) DNA end SB-tests. PCR kan desuden ofte udføres på DNA, der er isoleret fra paraffinindstøbt væv, hvor det ikke er muligt at udføre SB, da DNA'et ofte er nedbrudt. Det er derfor ønskværdigt at erstatte SB-analyse med pålidelige PCR-teknikker.

2.2. Sammendrag

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. Resultaterne fra denne BIOMED-2-undersøgelse kan ses i det førende peer-reviewed tidsskrift *Leukemia*². I en artikel fra 2007 i *Leukemia* fremgik det, at testning for både *TCRB*- og *TCRG*-gen-rearrangementer førte til 94% sensitivitet, sammenlignet med 91% for *TCRB* og 89% for *TCRG*, når der kun blev testet for den ene ting. Det kan også øge pålideligheden af testene, da det er mere sandsynligt, at de klonale produkter vil blive påvist i mere end ét rør.⁴

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

Dette testkit indeholder 6 mastermix. *TCRB*-rør A og B er rettet mod strukturområder inden for det variable område og joining-området for *TCR* betakæde-locuset. *TCRB*-rør C er rettet mod diversitets- og joining-områderne for *TCR*-betakæde-locuset. *TCRG*-rør A indeholder primere, der er rettet mod V γ 1-8 + V γ 10-gener og J γ 1.1, J γ 1.3, J γ 2.1 og J γ 2.3-gener (også kendt som henholdsvis J γ P1, J γ 1, J γ P2 og J γ 2). *TCRG*-rør B indeholder primere, der er rettet mod V γ 9 + V γ 11-gener og J γ 1.1, J γ 1.3, J γ 2.1 og J γ 2.3-gener. Endelig er Specimen Control Size Ladder-mastermixet rettet mod flere gener og genererer en serie amplikoner på cirka 96, 197, 297, 397 og 602 basepar for at sikre, at kvaliteten og kvantiteten af DNA er tilstrækkelig for at kunne give et gyldigt resultat. Et enkelt termocyclerprogram og tilsvarende påvisningsmetodologier anvendes med alle vores genklonalitetsanalyser. Dette forbedrer ensartetheden og gør det nemmere at krydstræne på et bredt udvalg af forskellige analyser.

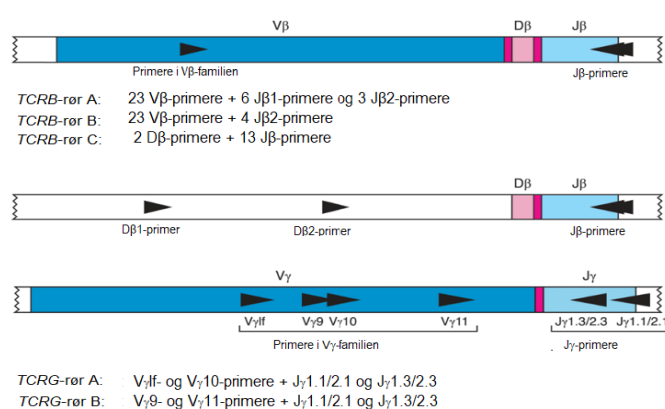
Denne analyse er baseret på EuroClonality/BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.



3. Testprincip

3.1. Polymerasekædereaktion (PCR)

PCR-analyser anvendes rutinemæssigt til identifikation af klonale T-cellepopulationer. Disse tests amplificerer DNA'et mellem primere, der er målrettet de konserverede variable (V) områder og de konserverede joining (J)-områder (*TCRB*-rør A & B og *TCRG*-rør A & B), samt diversitets- (D) og joining-områderne (*TCRB*-rør C). 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 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.) For DNA fra prøver, der indeholder en klonal population, er resultatet et eller to fremtrædende amplificerede produkter (amplikoner) inden for en formindsket polyklonal baggrund.



Figur 1. Dette er et forenklet diagram over et repræsentativt rearrangeret T-celle-receptor-beta-gen, der viser den omtrentlige placering af upstream og downstream DNA-primere. Antallet af primere og deres specificitet er angivet for mastermix *TCRB*-rør A, B og C og *TCRG*-rør A og B. (V γ 1f-primeren er en konsensus-primer, der er målrettet V γ 1 til V γ 8).

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 omgivende områder rundt om 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 målrettet 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.

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 basepar. 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.

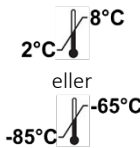
4. Reagenser

4.1. Reagenskomponenter

Tabel 1. Tilgængelige kits

Katalognummer	Produkt	Mængde
REF 92000011	IdentiClone <i>TCRB</i> + <i>TCRG</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 reaktioner
REF 92000021	IdentiClone <i>TCRB</i> + <i>TCRG</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 reaktioner

Tabel 2. Reagenskomponenter

Reagens	Katalognummer	Reagenskomponenter (aktive ingredienser)	Enheds-mængde	92000011 Antal enheder	92000021 Antal enheder	Opbevaringste mp.
Mastermix	22050011CE	<i>TCRB</i>-rør A – 6FAM & HEX Flere oligonukleotider, der er målrettet V β + J β 1 + J β 2 områderne i T-celle-receptor-beta-genet i en bufferet saltopløsning.	1500 μ L	1	10	
	22050021CE	<i>TCRB</i>-rør B – 6FAM Flere oligonukleotider, der er målrettet V β + J β 2 områderne i T-celle-receptor-beta-genet i en bufferet saltopløsning.	1500 μ L	1	10	
	22050031CE	<i>TCRB</i>-rør C – 6FAM & HEX Flere oligonukleotider, der er målrettet D β + J β 1 + J β 2 områderne i T-celle-receptor-beta-genet i en bufferet saltopløsning.	1500 μ L	1	10	
	22070031CE	<i>TCRG</i>-rør A – 6FAM & HEX Flere oligonukleotider, der er målrettet V γ 1-8, V γ 10 + flere J γ områder i T-celle-receptor-gamma-genet i en bufferet saltopløsning.	1500 μ L	1	10	
	22070041CE	<i>TCRG</i>-rør B – 6FAM & HEX Flere oligonukleotider, der er målrettet V γ 9, V γ 11 + flere J γ områder i T-celle-receptor-gamma-genet i en bufferet saltopløsning.	1500 μ L	1	10	
Template Amplification Control Master Mix	20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM Flere oligonukleotider rettet mod "housekeeping"-gener.	1500 μ L	1	10	
Positiv kontrol-DNA'er	40881210	IVS-0021 Clonal Control DNA 200 μ g/mL DNA i 1/10 TE-opløsning	100 μ L	1	5	
	40880490	IVS-0009 Clonal Control DNA 200 μ g/mL DNA i 1/10 TE-opløsning	100 μ L	1	5	
	40880190	IVS-0004 Clonal Control DNA 200 μ g/mL DNA i 1/10 TE-opløsning	100 μ L	1	5	
Negativ (normal) kontrol-DNA	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA 200 μ g/mL DNA i 1/10 TE-opløsning	100 μ L	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.
- Brug dette analysekit 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 der anvendes det korrekte termocyclerprogram, 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.
- Laboratoriepersonale skal bære passende personligt beskyttelsesudstyr og følge 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.
- Autoklaving kan ikke eliminere DNA-kontaminering. Sørg for en envejsarbejdsgang mellem separate arbejdsområder 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 optøse 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™ Thermal Cycler 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.
- Se flere oplysninger 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, knoglemarksbiopsi eller knoglemarvsaspirat anti-koaguleret 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. Medfølgende materialer

Katalognummer	Beskrivelse
REF 22050011CE	TCRB-rør A – 6FAM & HEX
REF 22050021CE	TCRB-rør B – 6FAM
REF 22050031CE	TCRB-rør C – 6FAM & HEX
REF 22070031CE	TCRG-rør A – 6FAM & HEX
REF 22070041CE	TCRG-rør B – 6FAM & HEX
REF 20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM
REF 40881210	IVS-0021 Clonal Control DNA
REF 40880490	IVS-0009 Clonal Control DNA
REF 40880190	IVS-0004 Clonal Control DNA
REF 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	05206944190	N/A
	Invivoscribe: FalconTaq DNA Polymerase eller tilsvarende	60970130	
Glasdestilleret deioniseret vand af molekylærbiologisk kvalitet eller USP-vand	N/A	N/A	DNase/RNase-frit
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	Thermo Fisher Scientific: ABI 310, 3100 eller 3500 series	N/A	N/A
Hi-Di Formamid	Thermo Fisher Scientific: Hi-Di™ formamid	4311320	N/A
Størrelsesstandarder	Invivoscribe: Hi-Di formamid m/ROX-størrelsesstandarder til ABI 3100	60980061	N/A
	Thermo Fisher Scientific: - Til ABI 3100- eller 3130-instrumenter: - GeneScan™ - 400HD [ROX]™	402985	
	- Til ABI 3500-instrumenter: - GeneScan - 600 [LIZ]™ v2.0	4408399	

Tabel 4. Nødvendige materialer (der ikke medfølger)

Reagens/materiale	Anbefalede reagenser/materialer og leverandører	Katalognummer	Bemærkninger
Farvesæt til spektral kalibrering	Thermo Fisher Scientific:		
	• 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	Thermo Fisher Scientific:		
	• POP-4™-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™-polymer:		
	▪ POP-7 til 3130/3130xL Genetic Analyzers	4352759	
	▪ POP-7 til 3500/3500xL Genetic Analyzers	4393714	
Buffer	Thermo Fisher Scientific:		
	• 10X buffer med EDTA til Genetic Analyzer	402824	Fortyndes i forholdet 1:10 i sterilt vand før brug

7.3. Klargøring af reagenser

- Test alle ukendte prøver ved hjælp af 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 tøj 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 45 µL til 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**):

n = 2 × antal prøver	(kør hver prøve i dobbeltbestemmelse)
+ 1	positiv kontrol-DNA (se Tabel 6)
+ 1	negativ kontrol-DNA (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	No Template-kontrol (NTC) (vand)
+ 1	til korrigering af pipetteringsfejl

n = 2 × 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 enkeltbestemmelse)
+ 1	negativ kontrol-DNA (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	No Template-kontrol (NTC) (vand)
+ 1	til korrigering af pipetteringsfejl

m = antal prøver + 3 I alt

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

- 7.3.3. **For *TCRB*-rør A og B:** Tilsæt 2,25 enheder (eller 0,45 µL ved 5 enheder/µL) Taq DNA polymerase pr. reaktion til hvert mastermix.
- Til hvert mastermix tilføjes en mængde Taq DNA polymerase på i alt **n × 0,45 µL**.
 - Vortex-mix forsigtigt for at blande.
- 7.3.4. **For *TCRB*-rør C og *TCRG*-rør A og B samt Specimen Control Size Ladder:** Tilsæt 1,25 enheder (eller 0,25 µL ved 5 enheder/µL) Taq DNA polymerase pr. reaktion.
- Til hvert mastermix tilføjes en mængde Taq DNA polymerase på i alt **n × 0,25 µL** til *TCRB*-rør C-mastermixet og **m × 0,25 µL** til Specimen Control Size Ladder-mastermixet.
 - Vortex-mix forsigtigt for at blande.
- 7.3.5. For hver reaktion udmåles 45 µL af det relevante mastermix + DNA-polymeraseopløsning i de enkelte brønde på en PCR-plade eller et rør.
- 7.3.6. 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.
- 7.3.7. Sæt låg på PCR-pladen eller dæk den til.
- Prøverne er nu klar til at blive amplificeret på en termocykler.
 - 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 × 45 µL

mastermix

n × 0,25 µL eller 0,45 µL*

Taq DNA-polymerase

Vortex-mix forsigtigt for at blande.

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

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

Reaktionsvolumen i alt = 50 µL

***Bemærk:**

Brug **0,45 µL** Taq DNA-polymerase til *TCRB*-rør A og B og **0,25 µL** Taq DNA-polymerase til *TCRB*-rør C og Specimen Control Size Ladder.

7.4. Amplifikation

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

- Brug den **forudberegnete** indstilling til temperaturmåling ved BioRad MJ PTC-termocyklere.

Tabel 5. Indstillinger for termocykler

Trin	Temperatur	Varighed	Cyklusser
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-baseparret har en forudgående top, der vises ved 84 basepar.

- Multiplex ikke PCR-produkter fra forskellige mastermix, 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 PCR-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 10 *Forventede værdier*)

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 PCR-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.
- 7.5.16. Data vises automatisk som størrelses- og farvespecifikke toppe. Gennemse profil og kontroller, og rapportér derefter resultaterne. (Se afsnit 8 *Fortolkning af resultater* og 10 *Forventede værdier*)

7.6. Kvalitetskontrol

Der medfølger positive og negative (eller normale) kontroller med kittet, der 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 de 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 basepar (bp) 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. De anførte amplikonstørrelser er blevet bestemt ud fra en ABI-plattform.

Tabel 6. Anbefalede positive kontroller

Mastermix	Mål	Farve	Kontrol-DNA	Katalog-nummer	Produktstørrelse (bp)
<i>TCRB-rør A</i>	Vβ + Jβ1/2	Blå (Jβ2,X) + Grøn (Jβ1,X)	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0009 Clonal Control DNA	--- 40880490	240 - 285 264
<i>TCRB-rør B</i>	Vβ + Jβ2	Blå (Jβ2,X)	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0004 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40880190 40881210	240 - 285 253 267
<i>TCRB-rør C</i>	Dβ + Jβ1/2	Blå (Jβ2,X) + Grøn (Jβ1,X)	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0009 Clonal Control DNA	--- 40880490	170 - 210 (Dβ2), 285 - 325 (Dβ1) 309
<i>TCRG-rør A</i>	Vγ1-8 + Vγ10 + flere Jγ områder	Blå (Jγ 1,1/2,1) + Grøn (Jγ 1,3/2,3)	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40881210	145 - 255 211 (Vγ1-8 + Jγ1,3/2,3)
<i>TCRG-rør B</i>	Vγ9 Vγ11 + flere Jγ områder	Blå (Jγ 1,1/2,1) + Grøn (Jγ 1,3/2,3)	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40881210	80 - 220 167 (Vγ9 + Jγ1,3/2,3)
Specimen Control Size Ladder	Flere gener	Blå	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	96, 197, 297, 397, 602 ^a 96, 197, 297, 397, 602 ^a

^aBemærk: Da amplificeringen fortrinsvist foretages for mindre PCR-fragmenter, er det ikke usædvanligt, at 600 bp-fragmentet har et formindsket signal eller mangler helt.

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 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 ombytet.
- 8.1.4. Alle analysekontroller skal undersøges inden fortolkning af prøveresultater.

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 de amplificerede produkter</i> . Ingen klonale rearrangementer til stede. Fortsæt med analysen.	Klonale rearrangementer til stede. Gentag analysen.
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 de amplificerede produkter</i> . Fortsæt med analysen.	Produktet ligger ikke inden for det gyldige størrelsesinterval. 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 bp ses, fortsættes med analysen. Da amplificeringen fortrinsvist foretages for mindre PCR-fragmenter, er det ikke usædvanligt, at 600 bp-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, 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:

- Et eller to af de fremtrædende positive bånd^a inden for det gyldige størrelsesinterval rapporteres som:
“Positive for the detection of clonal T cell receptor beta chain or gamma chain gene rearrangement(s) consistent with the presence of a clonal cell population.” (“Positive for påvisning af klonale T-celle-receptor-betakæde- eller gammakæde-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 bånd^a inden for det gyldige størrelsesinterval rapporteres som:
“Negative for the detection of clonal T cell receptor beta chain or gamma chain gene rearrangement(s).” (“Negativ for påvisning af klonale T-celle-receptor-betakæde- eller gammakæde-gen-rearrangement(er).”)

^a**Bemærk:** Kriterierne for at kunne definere et positivt bånd 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. Produkter genereret fra prøver, der ligger inden for det gyldige størrelsesinterval og producerer et eller flere separat(e) bånd fra en given baggrunds-smear, er ensbetydende med et positivt bånd.

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 dit specifikke kapillær elektroforese-instrument, kan variere med 1 til 4 basepar (bp) 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. De anførte amplikonstørrelser er blevet bestemt ud fra en ABI-platform.

Tabel 8. Forventet størrelse på amplificerede produkter

Mastermix	Mål	Farve	Kontrol-DNA	Katalog-nummer	Produktstørrelse (bp)
TCRB-rør A	Vβ + Jβ1/2	Blå (Jβ2,X) + Grøn (Jβ1,X)	Gyldigt størrelsesinterval	---	240 - 285
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	240 - 285, 271 ^a
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	264
			IVS-0004 Clonal Control DNA	40880190	295
TCRB-rør B	Vβ + Jβ2	Blå (Jβ2,X)	Gyldigt størrelsesinterval	---	240 - 285
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	240 - 285, 221 ^b
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	---
			IVS-0004 Clonal Control DNA	40880190	253
TCRB-rør C	Dβ + Jβ1/2	Blå (Jβ2,X) + Grøn (Jβ1,X)	Gyldigt størrelsesinterval	---	170 - 210 (Dβ2), 285 - 325 (Dβ1)
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	128 ^b , 170 - 210, 285 - 325, 337 ^b
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	309
			IVS-0004 Clonal Control DNA	40880190	295
TCRG-rør A	Vγ1-8, Vγ10 + flere Jγ områder	Blå (Jγ 1,1/2,1) + Grøn (Jγ 1,3/2,3)	Gyldigt størrelsesinterval	---	145 - 255
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	230 - 255 (Vγ1-8 + Jγ 1,1/2,1), 195 - 230 (Vγ1-8 + Jγ 1,3/2,3), 175 - 195 (Vγ10 + Jγ 1,1/2,1), 145 - 175 (Vγ10 + Jγ 1,3/2,3)
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	212 (Vγ1-8 + Jγ 1,3/2,3)
			IVS-0021 Clonal Control DNA	40881210	211 (Vγ1-8 + Jγ 1,3/2,3)
TCRG-rør B	Vγ9 Vγ11 + flere Jγ områder	Blå (Jγ 1,1/2,1) + Grøn (Jγ 1,3/2,3)	Gyldigt størrelsesinterval	---	80 - 220
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	195 - 220 (Vγ9 + Jγ 1,1/2,1), 160 - 195^c (Vγ9 + Jγ 1,3/2,3), 110 - 140^d (Vγ11 + Jγ 1,1/2,1), 80 - 110^d (Vγ11 + Jγ 1,3/2,3)
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	115 ^e (Vγ11 + Jγ 1,3/2,3)
			IVS-0021 Clonal Control DNA	40881210	167 (Vγ9 + Jγ 1,3/2,3)
Specimen Control Size Ladder	Flere gener	Blå	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0000 Polyclonal Control DNA	---	96, 197, 297, 397, 602^f 96, 197, 297, 397, 602 ^f

^aBemærk: 271 bp-båndet ses især ved prøver med et lavt antal kontaminerende lymfeceller.

^bBemærk: Hvis forholdene ikke er optimale, vil der kunne påvises ikke-specifikke produkter af 221 bp (i rør B) og 128 og 337 bp (i rør C). Hvis disse bånd er til stede, vil de normalt være svage.

^cBemærk: Da amplificeringen fortrinsvist foretages for mindre PCR-fragmenter, er det ikke usædvanligt, at 602 bp-fragmentet har et formindsket signal eller mangler helt.

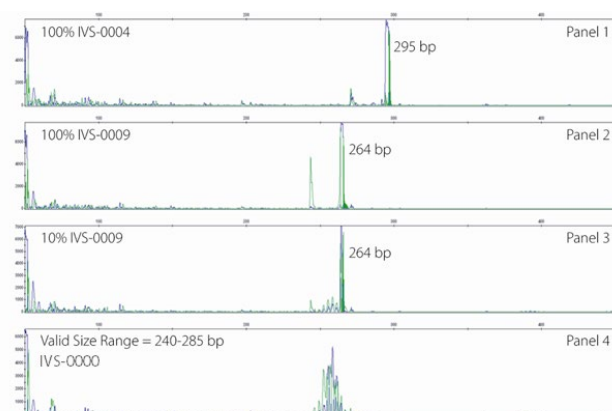
^dBemærk: Amplikonprodukter ses sjældent i dette størrelsesinterval. Dette er et meget begrænset udvalg.

^eBemærk: Dette kan ses som et svagt amplikon.

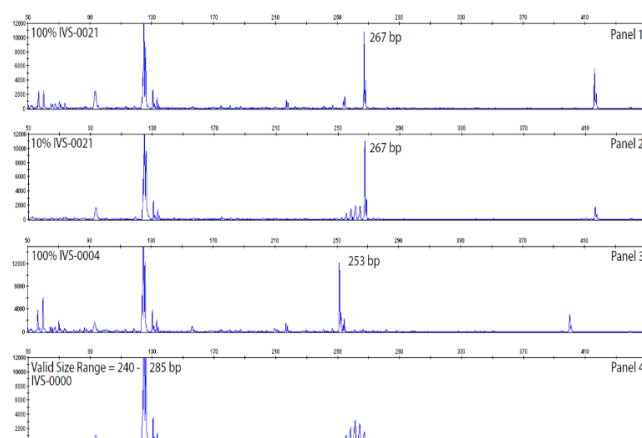
^fBemærk: Da amplificeringen fortrinsvist foretages for mindre PCR-fragmenter, er det ikke usædvanligt, at 602 bp-fragmentet har et formindsket signal eller mangler helt.

10.2. Prøvedata

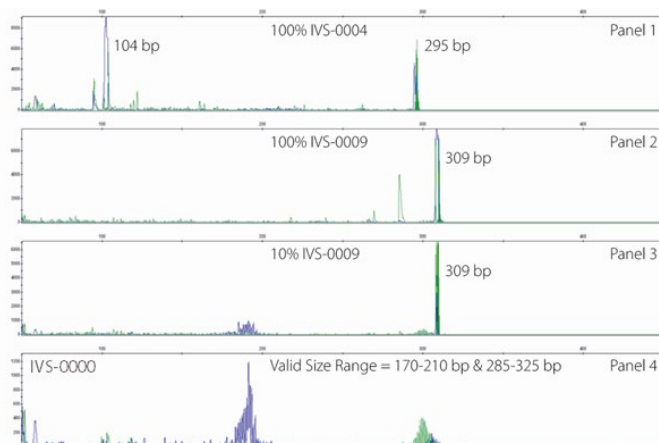
De data, der er vist i figur 2 - 7, er genereret ved hjælp af de angivne mastermix. Amplificerede produkter blev kørt på et ABI-instrument.



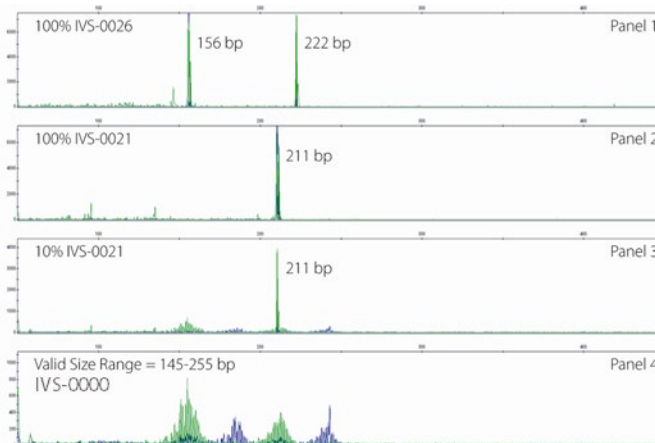
Figur 1. TCRB-rør A – 6FAM & HEX



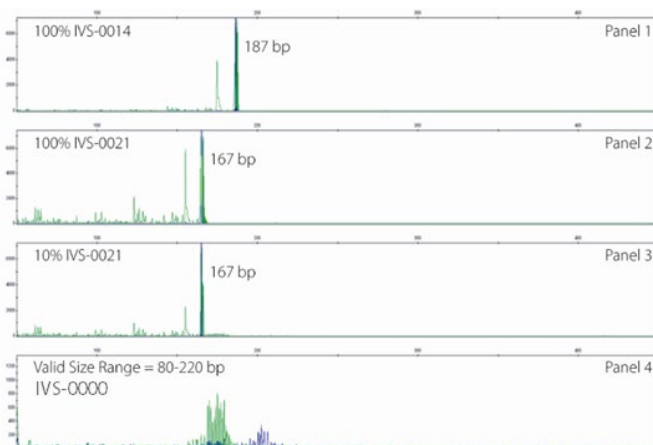
Figur 2. TCRB-rør B – 6FAM



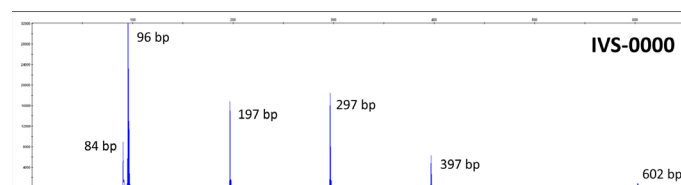
Figur 3 TCRB-rør C – 6FAM & HEX



Figur 4 TCRG-rør A – 6FAM & HEX



Figur 5 TCRG-rør B – 6FAM & HEX



Figur 6 Specimen Control Size Ladder – 6FAM-mastermix

11. Karakteristika for ydeevnen

Denne IdentiClone *TCRB* + *TCRG* T-Cell 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. Dette understøttes af to betydningsfulde artikler, den ene offentliggjort i 2003 i tidsskriftet *Leukemia* af van Dongen et al. og den anden offentliggjort i 2005 i *Journal of Molecular Diagnostics* (JMD) af Sandberg et al.

Tabel 9. Sammenligning af PCR og Southern Blot-påvisning

PCR/SB-overensstemmelse (<i>Leukemia</i>): ²		PCR/SB-overensstemmelse (<i>Journal of Molecular Diagnostics</i>): ³	
<i>IGH</i> :	93% sensitivitet/ 92% specificitet	<i>IGH</i> + <i>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
IGH + IGK:	85%	98%	39%
TCRB:	85%	96%	35%

Undersøgelsen foretaget af Sandberg *et al.* var en uafhængig undersøgelse af 300 patientprøver fra en række forskellige typer af prøvemateriale. 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. 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

13. 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.

14. Symboler

Følgende symboler anvendes nu ved mærkning af diagnostiske produkter fra Invivoscribe.

	Katalognummer		Udløbsdato
	Reagensvolumen		Autoriseret Repræsentant i EU
	Lotnummer		Se brugsanvisning
	Opbevaringsbetingelser		In-vitro-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®) bestreber 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 affilierede selskaber eller (med hensyn til andres varemærker brugt heri) deres respektive ejere.