



Brugsanvisning

CE IVD

Identicleone® *IGK* Gene Clonality Assay



 invivoscribe®



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

Katalognummer

REF 91020020
REF 91020030

Produkter

Identicleone *IGK* Gene Clonality Assay – Gel Detection
Identicleone *IGK* Gene Clonality Assay MegaKit – Gel Detection

Antal

33 reaktioner
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.	Gelpåvisning.....	4
4.	REAGENSER.....	5
4.1.	Reagenskomponenter.....	5
4.2.	Advarsler og forholdsregler.....	5
4.3.	Opbevaring og håndtering.....	6
5.	INSTRUMENTER.....	6
5.1.	Termocykler	6
5.2.	Elektroforese-enhed.....	6
5.3.	UV-belysningsenhed.....	6
6.	INDSAMLING OG KLARGØRING AF PRØVEMATERIALE.....	7
6.1.	Forholdsregler.....	7
6.2.	Interfererende stoffer.....	7
6.3.	Krav til prøvemateriale samt håndtering.....	7
6.4.	Klargøring af prøve.....	7
6.5.	Prøveopbevaring.....	7
7.	ANALYSEPROCEDURE	8
7.1.	Medfølgende materialer	8
7.2.	Nødvendige materialer (der ikke medfølger).....	8
7.3.	Klargøring af reagenser	9
7.4.	Amplifikation	10
7.5.	Gelpåvisning – Heteroduplex-analyse	10
7.6.	Kvalitetskontrol.....	10
7.7.	Anbefalede positive kontroller.....	11
8.	FORTOLKNING AF RESULTATER	11
8.1.	Analyse.....	11
8.2.	Fortolkning af prøver.....	12
9.	PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER.....	12
10.	FORVENTEDE VÆRDIER.....	12
10.1.	Forventet størrelse på amplificerede produkter.....	12
10.2.	Prøvedata.....	13
11.	KARAKTERISTIKA FOR YDEEVNEN	14
12.	BIBLIOGRAFI.....	14
13.	TEKNISK ASSISTANCE OG KUNDESERVICE.....	14
14.	SYMBOLER	15
15.	JURIDISK MEDDELELSE	15
15.1.	Garanti og ansvar	15
15.2.	Patenter og varemærker	15
15.3.	Meddelelse til køber – KUN EagleTaq DNA Polymerase.....	15

1. Tilsigtet anvendelse

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

- identificere klonalitet i atypiske lymfeproliferative lidelser
- understøtte differentialdiagnosticering af reaktive læsioner og hæmatologiske maligniteter
- bestemme formodet afstamning ved modne monoklonale lymfeproliferative lidelser
- identificere tumorspecifikke markører (*IGK* og *IGK-K_{de}* 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 lymfocytopopulationer, 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 Identicleone-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 gel-påvisningsbaserede analyser kan ikke med sikkerhed påvise klonale populationer, der omfatter mindre end 5% af den totale lymfocytcellepopulation. Resultaterne af molekulære klonalitetstests skal altid fortolkes i sammenhæng med kliniske, histologiske og immunfænotypiske data.

2.2. Sammendrag

Dette testkit indeholder tre (3) mastermix. *IGK*-rør A mastermixet er rettet mod det variable (V) område og joining (J)-området i Ig kappa letkæde-locuset. *IGK*-rør B mastermixet er derimod rettet mod kappa deleting element (K_{de})-rearrangementer i det variable (V) område og det intragene J_k-C_k område. De resulterende V_k-K_{de} og J_k-C_k intron-K_{de} rearrangementer skyldes forfejlede rearrangementer, der er bevaret af B-cellen. Det tredje mastermix, Specimen Control Size Ladder, er rettet mod flere gener og genererer en serie på cirka 100, 200, 300, 400 og 600 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 vores genkonalitetsanalyser. Dette forbedrer ensartetheden og gør det nemmere at krydstræne på et bredt udvalg af forskellige analyser.

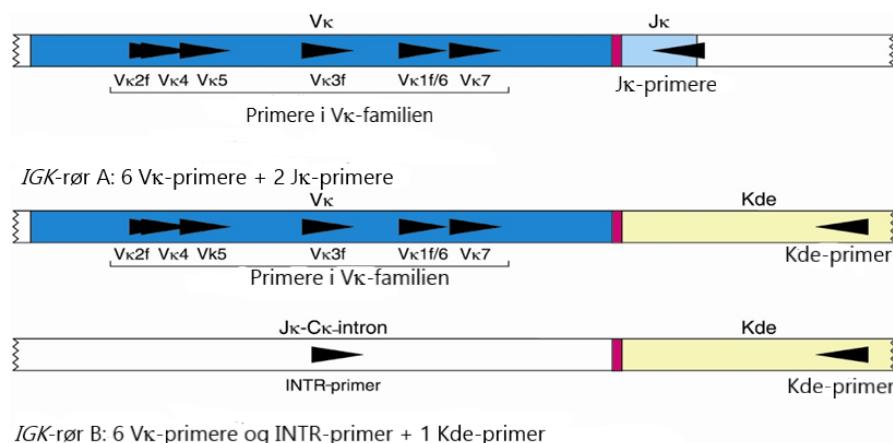
Denne analyse er baseret på EuroClonality/BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.



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 variable (V) område og joining (J)-området (*IGK*-rør A) eller det variable område, *Jκ*-C_κ intron-området og K_{de}-området (*IGK*-rør B). De konserverede V- og J-områder ligger på begge sider af det hypervariable, komplementaritetsbestemmende område 3 (CDR3), 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-cellér og T-celle-receptor-gener i T-cellér. 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. På en gel ses denne produktfordeling som en smear. 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 kappa lettkæde-gen på kromosom 2p11.2. Der vises de relative positioner og retninger for V_κ-, J_κ- og Kde-primer, der er indeholdt i rørene med *IGK*-mastermix.

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-primersekvenser til at være målrettet alle de konserverede områder rundt om V-J-rearrangementet. N-områdets 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. Ved V_κ-J_κ-rearrangementer er længden af CDR3 begrænset, og rearrangementer i dette område vil forekomme væsentligt skæve (platykurtose).⁴ PCR-produkter udviser således en meget snæver gaussisk fordeling og kan nemmest identificeres ved hjælp af heteroduplex analyse.

3.2. Gelpåvisning

Gel-elektroforese, f.eks. i form af agarose-gel-elektroforese eller ikke-denaturerende polyakrylamid-gel-elektroforese (PAGE), anvendes ofte til at afklare de forskellige amplikonprodukter baseret på deres størrelse, ladning og konformation. Da DNA bliver negativt ladet, når en elektrisk spænding påføres gelen, som indeholder PCR-produkterne, vil det elektriske felt få amplikonerne til at migrere gennem gelen. Mindre DNA-fragmenter kan nemt migrere gennem gelmatrixen, mens større DNA-fragmenter migrerer langsommere. Dette betyder, at amplikonprodukterne fordeles efter størrelse. Ethidiumbromid eller andre DNA-interkalerende farver kan derefter anvendes til at farve og detektere disse produkter i gelen.

Der kan også køres en heteroduplex-analyse på en polyakrylamidgel for at skelne mellem klonale og ikke-klonale PCR-produkter. En heteroduplex-analyse indebærer, at PCR-produkterne denatureres ved høj temperatur, hvorefter DNA-strenge har hurtigt bindes igen (re-annealing), når temperaturen pludselig sænkes. Dette betyder, at en stor del af DNA-strenge fejlagtigt binder sig til andre ikke-homologe strenge, hvilket skaber løkker i DNA'et. Løkkerne forårsager en betydelig reduktion i DNA'ets evne til at migrere gennem polyakrylamidgel. Hvis størstedelen af PCR-produkterne er klonale, når der foretages en heteroduplex-analyse, vil de fleste af disse PCR-produkter dog genbindes (re-annealing) korrekt med en homolog streng. Disse PCR-produkter vil køre normalt gennem polyakrylamidgelen. Derfor vil en heteroduplex-analyse i en klonal prøve med en polyklonal baggrund betyde, at det meste af det polyklonale produkt vil køre meget langsomt gennem polyakrylamidgelen, hvilket vil forøge separationen og muligheden for at identificere de(t) klonale bånd.

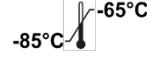
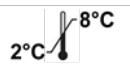
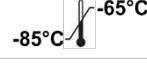
4. Reagenser

4.1. Reagenskomponenter

Tabel 1. Tilgængelige kits

Katalognummer	Beskrivelse	Mængde
REF 91020020	IdentiClone <i>IGK</i> Gene Clonality Assay – Gel Detection	33 reaktioner
REF 91020030	IdentiClone <i>IGK</i> Gene Clonality Assay MegaKit – Gel Detection	330 reaktioner

Tabel 2. Reagenskomponenter

Reagens	Katalog-nummer	Reagenskomponenter (aktive ingredienser)	Enheds-mængde	91020020 Antal enheder	91020030 Antal enheder	Opbevarings-temp.
Mastermix	21020010CE	<i>IGK</i>-rør A - umærket Flere oligonukleotider, der er rettet mod det variable område og joining-områderne i immunglobulin kappa letkæde-genet i en bufferet saltopløsning.	1500 µL	1	10	
	21020020CE	<i>IGK</i>-rør B - umærket Flere oligonukleotider, der er målrettet det variable område, Jκ-Cκ intron-området og Kde-området i immunglobulin kappa letkæde-genet i en bufferet saltopløsning.	1500 µL	1	10	
Template Amplification Control Master Mix	20960020	Specimen Control Size Ladder – umærket Flere oligonukleotider rettet mod "housekeeping"-gener.	1500 µL	1	10	
Positiv kontrol-DNA	40880370	IVS-0007 Clonal Control DNA 200 µg/mL DNA i 1/10 TE-opløsning	100 µL	1	5	 eller 
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, reducering 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 anviset. 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 amplifieret 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 arbejdsmiljøet 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 amplifieret 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 steril 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 også muligt at langtidsopbevare 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 resuspendederede. 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 anviset. 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
- 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. Elektroforese-enhed

- Brug eller funktion: Separering af DNA-fragmenter
- Specifikation og karakteristika for ydeevnen:
 - Kan køre ved 35V til 135V i længere tid
- Følg producentens procedurer for installation, drift, kalibrering og vedligeholdelse.

5.3. UV-belysningsenhed

- Brug eller funktion: DNA-detektion
- Specifikation og karakteristika for ydeevnen:
 - Kan udsende lys ved en bølgelængde på ~302 nm
- Følg producentens procedurer for installation, drift, kalibrering og vedligeholdelse.

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)
- 2 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 genomske DNA fra patientprøverne. Resuspende 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
21020010CE	<i>IGK</i> -rør A - umærket
21020020CE	<i>IGK</i> -rør B - umærket
20960020	Specimen Control Size Ladder – umærket
40880370	IVS-0007 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 Invivoscrite, Inc.: • HotStart Taq DNA Polymerase ¹ eller tilsvarende	05206944190 60970100	N/A
Glasdestilleret deioniseret vand af molekylærbiologisk kvalitet eller USP-kvalitet	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	Bio-Rad: • MJ Research PTC-100 eller PTC-200, PTC-220, PTC-240	N/A	N/A
Vortex-mixer	N/A		N/A
PCR-plader eller -rør	N/A		Sterile
Pipettespidser med filterbarriere	N/A		Sterile, RNase/DNase/pyrogen-frie
Mikrocentrifugerør	N/A		Sterile
Gelelektroforese-enhed	N/A		Til polyakrylamidgeler
Ethidiumbromid	Thermo Fisher Scientific®: • UltraPure® 10 mg/mL ethidiumbromid	15585-011	N/A
6% polyakrylamidgeler	Thermo Fisher Scientific: • Novex® TBE-geler (6%, 12 brønde)	EC62652Box	N/A
TBE-kørselsbuffer	Invitrogen: • Novex TBE-kørselsbuffer (5X)	LC6675	Fortsyndes i forholdet 1:5 inden brug.
Gel-loading-buffer	Thermo Fisher Scientific: • 10X BlueJuice™ gel-loading-buffer • Novex Hi-Density TBE-prøvebuffer (5X)	10816-015 LC6678	N/A
100 bp DNA-ladder	Invitrogen: • TrackIt™ 100 bp DNA-ladder	10488-058	N/A

¹Bemærk: Dette produkt er kun beregnet til salg og brug i det Europæiske Økonomiske Samarbejdsområde (EØS). Produktet må ikke videresælges eller overdrages til andre parter. Se også Juridisk meddelelse i afsnit 15.

7.3. Klargøring af reagenser

- Test alle ukendte prøver med Specimen Control Size Ladder-mastermix for at sikre, at der ikke findes amplifikationsinhibitorer, og at der findes DNA af tilstrækkelig kvalitet og kvantitet til at kunne generere et gyldigt resultat.
- Testresultater fra enkeltbestemmelse er gyldige, men der bør testes 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.

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 mikrocentrifugører.

- 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) således:

$n = 2 \times \text{antal prøver}$	(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 = $n \times 45 \mu\text{L}$.
- For Specimen Control Size Ladder-mastermix vil antallet af reaktioner (m) være:

$m = \text{antal prøver}$	(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 $m \times 45 \mu\text{L}$.

7.3.3. Tilsæt 1,25 enheder (eller 0,25 μL ved 5 enheder/ 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 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:

$n \times 45 \mu\text{L}$ 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 **forudberegnede** indstilling til temperaturmåling med BioRad MJ Research PTC-termocyklere.

Tabel 5: Indstillinger for termocykler

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

7.4.2. Fjern amplifikationspladen eller rørene fra termocykleren.

- 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. Gelpåvisning – Heteroduplex-analyse

- Undlad at heteroduplikere PCR-produkter fra Specimen Control Size Ladder-mastermixet. Spring trin 7.5.1 – 7.5.3 over, og fortsæt fra trin 7.5.4.

7.5.1. Denaturer 20 µL PCR-produkt ved 94°C i 5 minutter.

7.5.2. Nedkøl hurtigt for at genbinde (re-annealing) PCR-produkter ved 4 °C (i et bad med isvand) i 60 minutter.

7.5.3. Montér elektroforese-enheden med en ikke-denaturerende 6% polyakrylamid-TBE-gel og 1X TBE-kørselsbuffer.

7.5.4. Bland 20 µL af hver prøve med 5 µL iskoldt ikke-denaturerende 5X bromophenol blå loading-buffer.

7.5.5. Fyld 20 µL af blandingen i de enkelte brønde på gelen.

7.5.6. Kør gelen ved 110 V i 2-3 timer eller ved 40-50 V natten over.

- Spændingen og elektroforesetid afhænger af PCR-amplikonstørrelsen og tykkelsen af polyakrylamidgelen.
- Spænding og kørselstid kan tilpasses tilsvarende.

7.5.7. Farv gelerne med 0,5 µg/mL ethidiumbromid (i vand eller 0,5X TBE-buffer) i 5-10 minutter.

7.5.8. Fjern farven fra gelerne i vand i 5-10 minutter. Gentag med frisk vand.

7.5.9. Placér gelen over UV-belysningen for at visualisere båndene.

7.5.10. Fotografér og fortolk resultatdataene. (Se afsnit 8 *Fortolkning af resultater* og 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 krydkontaminering 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 amplifikonstørrelser er blevet bestemt ud fra en ABI-platform.

Tabel 6: Forventet størrelse på de anbefalede kontroller

Mastermix	Mål	Kontrol-DNA	Katalognummer	Produktstørrelse i nukleotider (nt)
IGK-rør A	Vκ - Jκ	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40880370	120 - 160, 190 - 210, 260 - 300 143
IGK-rør B	Vκ - K _{de} + intron-K _{de}	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40880370	210 - 250, 270 - 300, 350 - 390 274, 282
Specimen Control Size Ladder	Flere gener	Gyldigt størrelsesinterval IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	100, 200, 300, 400, 600^a 100, 200, 300, 400, 600 ^a

^aBemærk: Da amplificeringen fortinsvist foretages for mindre PCR-fragmenter, er det ikke usædvanligt, at 600 nt-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 fortolkkes 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, kan 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 fortolkkes.

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.
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 100, 200, 300, 400 og 600 nt ses, fortsættes med analysen. Da amplificeringen fortinsvist foretages for mindre PCR-fragmenter, er det ikke usædvanligt, at 600 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, 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, kan 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 immunoglobulin kappa light chain gene rearrangement(s) consistent with the presence of a clonal cell population.” (“Positive for påvisning af klonale immunglobulin kappa letkæde-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 bånd^a inden for det gyldige størrelsesinterval rapporteres som:
“Negative for the detection of clonal immunoglobulin kappa light chain gene rearrangement(s).” (Negativ for påvisning af klonal immunglobulin kappa letkæde-gen-rearrangement(er).)

^aBemærk: Kriterierne for at kunne definere et positivt bånd er følgende:

- Produkter genereret fra prøver, der ligger inden for det gyldige størrelsesinterval og producerer et eller flere separat(e) bånd fra en given baggrundssmear, er ensbetydende med et positivt bånd.

9. Procedurens begrænsninger

- Denne analyse identifierer ikke 100% af klonale cellepopulationer.
- Analysen kan ikke med sikkerhed påvise færre end fem (5) positive celler pr. 100 normalceller.
- Resultaterne af molekylære 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.

Tabel 8: Forventet størrelse på amplificerede produkter

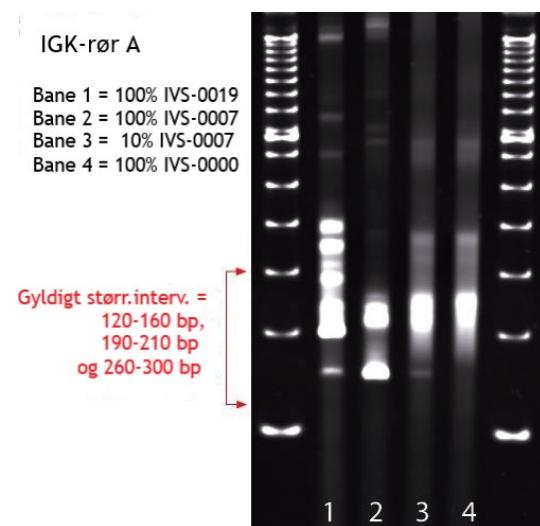
Mastermix	Mål	Kontrol-DNA	Katalognummer	Produktstørrelse i nukleotider
<i>IGK-rør A</i>	VK - JK	Gyldigt størrelsesinterval	---	120 - 160, 190 - 210, 260 - 300
		IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	135-155
		IVS-0007 Clonal Control DNA	40880370	143
<i>IGK-rør B</i>	VK - K _{de} + intron-K _{de}	Gyldigt størrelsesinterval	---	210 - 250, 270 - 300, 350 - 390
		IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	225 - 245, 265 - 285, 404 ^a
Specimen Control Size Ladder	Flere gener	Gyldigt størrelsesinterval	---	274, 282
		IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	100, 200, 300, 400, 600^b
				100, 200, 300, 400, 600 ^b

^a**Bemærk:** Hvis forholdene ikke er optimale, vil der kunne påvises et ikke-specifikt produkt på 404 nt i rør B. Negativ kontrol-DNA vil ikke vise dette bånd inden for den samme undersøgelse, da der ellers ikke kan skelnes mellem specifikt og ikke-specifikt. Hvis der er et bånd til stede, skal dette bånd anses for at være ikke-specifikt.

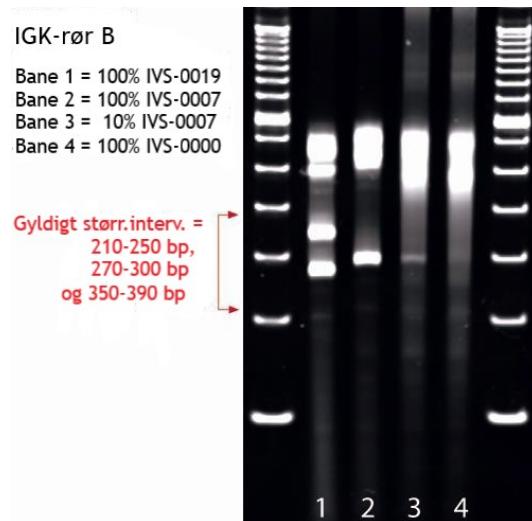
^b**Bemærk:** Da amplificeringen fortrinsvist foretages for mindre PCR-fragmenter, er det ikke usædvanligt, at 600 nt-fragmentet har et formindsket signal eller mangler helt.

10.2. Prøvedata

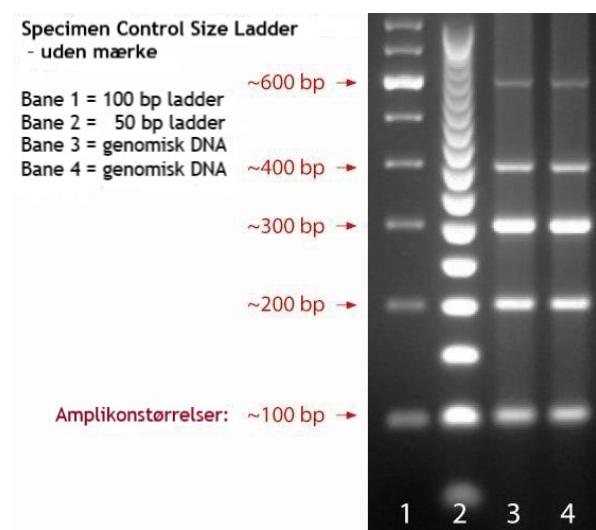
De data, der er vist til venstre, er genereret ved hjælp af de angivne mastermix. Amplificerede produkter blev heteroduplikeret og kørt på en 6% polyakrylamidgel.



Figur 1. *IGK*-rør A



Figur 2. *IGK*-rør B



Figur 3. Specimen Control Size Ladder. De data, der er vist til venstre, er genereret ved hjælp af det angivne mastermix. Amplificerede produkter blev kørt på en 2% agarosegel.

11. Karakteristika for ydeevnen

Denne IdentiClone *IGK* 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 lymfeproliferationer. Den endelige kliniko-histopatologiske diagnose korrelerer godt med PCR-resultater hos et større antal patienter sammenlignet med SB-resultater.^{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%
<i>TCRB</i> :	85%	96%

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 sandsynlige 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

- Miller, JE, Wilson, SS, Jaye, DJ, Kronenberg, M. An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Mol. Diag.* 1999, 4(2):101-117.
- Van Dongen, JJM *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003, 17(12):2257-2317.
- Sandberg, Y, van Gastel-Mol, EJ, Verhaaf, B, Lam, KH, van Dongen, JJM, Langerak, AW. BIOMED-2 multiplex immunoglobulin/T-cell receptor polymerase chain reaction protocols can reliably replace Southern Blot analysis in routine clonality diagnostics. *J. Mol. Diag.* 2005, 7(4):495-503.
- Rock, EP, Sibbald, PR, Davis MM, Chein, YH. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J. Exp. Med.* 1994, 179(1):323-328.

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, Bldg. 1
San Diego, California 92121-2711
USA

Autoriseret repræsentant og teknisk assistance i EU

 Invivoscribe Technologies, SARL
Le Forum – Bât B
515 Avenue de la Tramontane
ZI Athélia IV
13600 La Ciotat, France

Telefon: +1 858 224-6600
Fax: +1 858 224-6601
Teknisk service: support@invivoscribe.com
Kundeservice: sales@invivoscribe.com
Websted: www.invivoscribe.com
Ekspeditionstider: 7:00AM – 5:00PM PST/PDT

Telefon: +33 (0)4 42 01 78 10
Fax: +33 (0)4 88 56 22 89
Teknisk service: support@invivoscribe.com
Kundeservice: sales-eu@invivoscribe.com
Websted: www.invivoscribe.com
Ekspeditionstider: 9:00AM – 5:00PM CET/CEST

14. Symbler

Følgende symboler anvendes ved mærkning af diagnostiske produkter fra Invivoscribe.

 IVD	Til <i>in vitro</i> -diagnostisk brug	 Udløbsdato
 REF	Katalognummer	 EC REP Autoriseret repræsentant i EU
 VOL	Reagensvolumen	 Fabrikant
 LOT	Lotnummer	 Se brugsanvisning
	Opbevaringsbetingelser	

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 indlægsseddelf. Hvis et produkt er omfattet af produktetspecifikationer, 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 ansvarsbegrensning, 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.

Identicloud® er et registreret varemærke fra Invivoscribe®.

©2021 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.

15.3. Meddelelse til køber – KUN EagleTaq DNA Polymerase

Dette produkt er kun beregnet til salg til forskningsbrug i det Europæiske Økonomiske Samarbejdsområde (EØS). Produktet må ikke videresælges eller overdrages til andre parter. Brugen af dette produkt er omfattet af USA-patentnummer 6,127,155 og tilsvarende patentansøgninger uden for USA. Køberen af dette produkt må kun bruge dette nævnte produkt til købers egen interne forskning. Der gives ingen rettigheder under andre patentkrav og ingen rettigheder til at udføre kommercielle serviceydelser af nogen slags, herunder, uden begrænsning, rapportering af resultater fra købers aktiviteter for et vederlag eller anden form for kommerciel modydelse, hverken udtrykkeligt, stiltiende eller ved antagelse. Dette produkt må kun anvendes til forskningsbrug. Human og veterinær diagnostisk brug under Roche-patentkrav kræver en særskilt licens fra Roche. Alle andre anvendelsesområder end intern forskning og human og veterinær diagnostisk brug under Roche-patentkrav kræver en særskilt licens fra Thermo Fisher Scientific. Ved at anvende dette produkt accepterer du samtidigt ovenstående. Yderligere oplysninger om køb af licenser fra Roche kan fås ved at kontakte the Licensing Department of Roche Molecular Systems, Inc., 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, California 94588, USA eller Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim, Deutschland. Yderligere oplysninger om køb af licenser fra Thermo Fisher Scientific kan fås ved at kontakte the Licensing Department of Thermo Fisher Scientific, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008, USA.