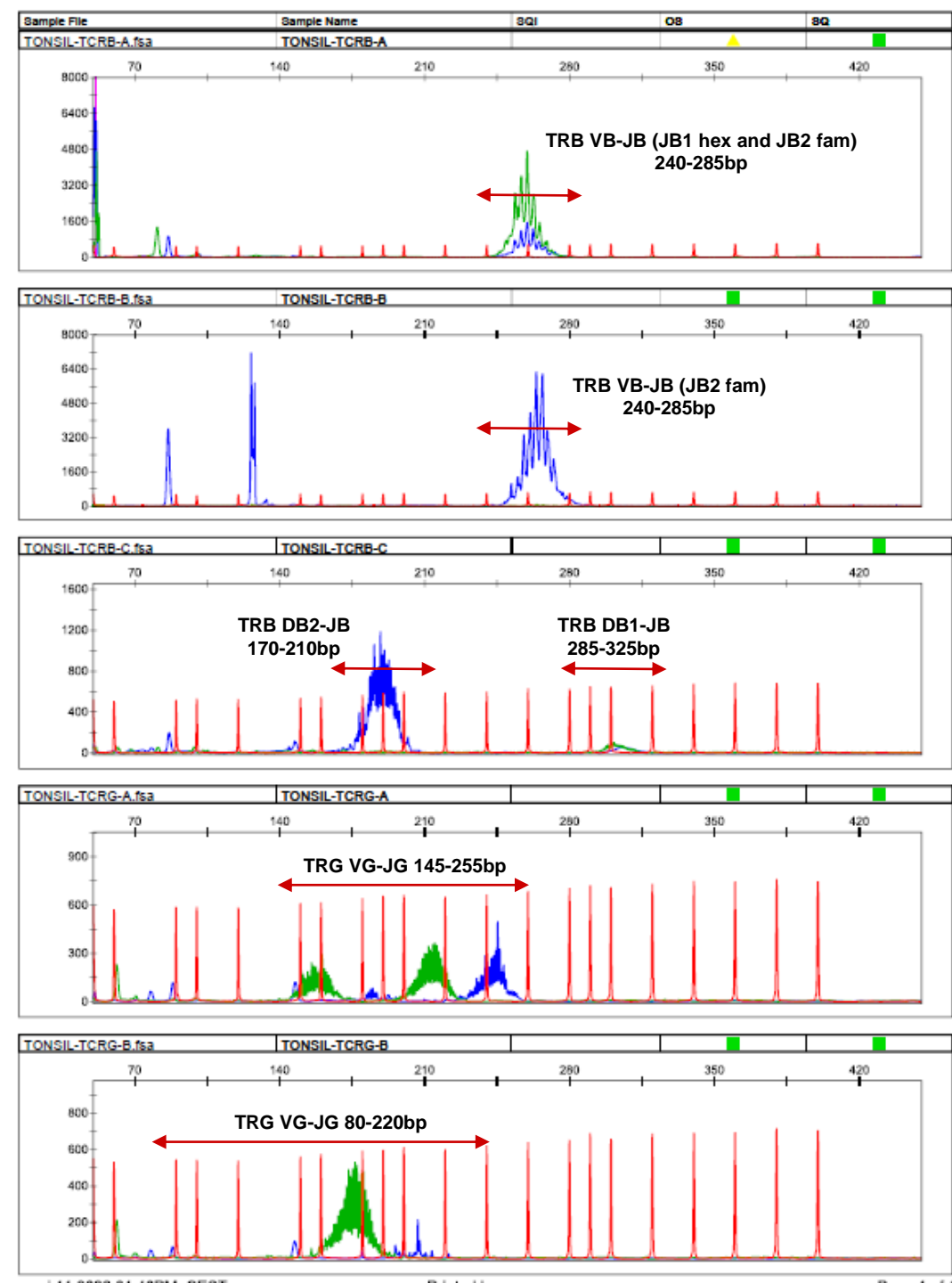
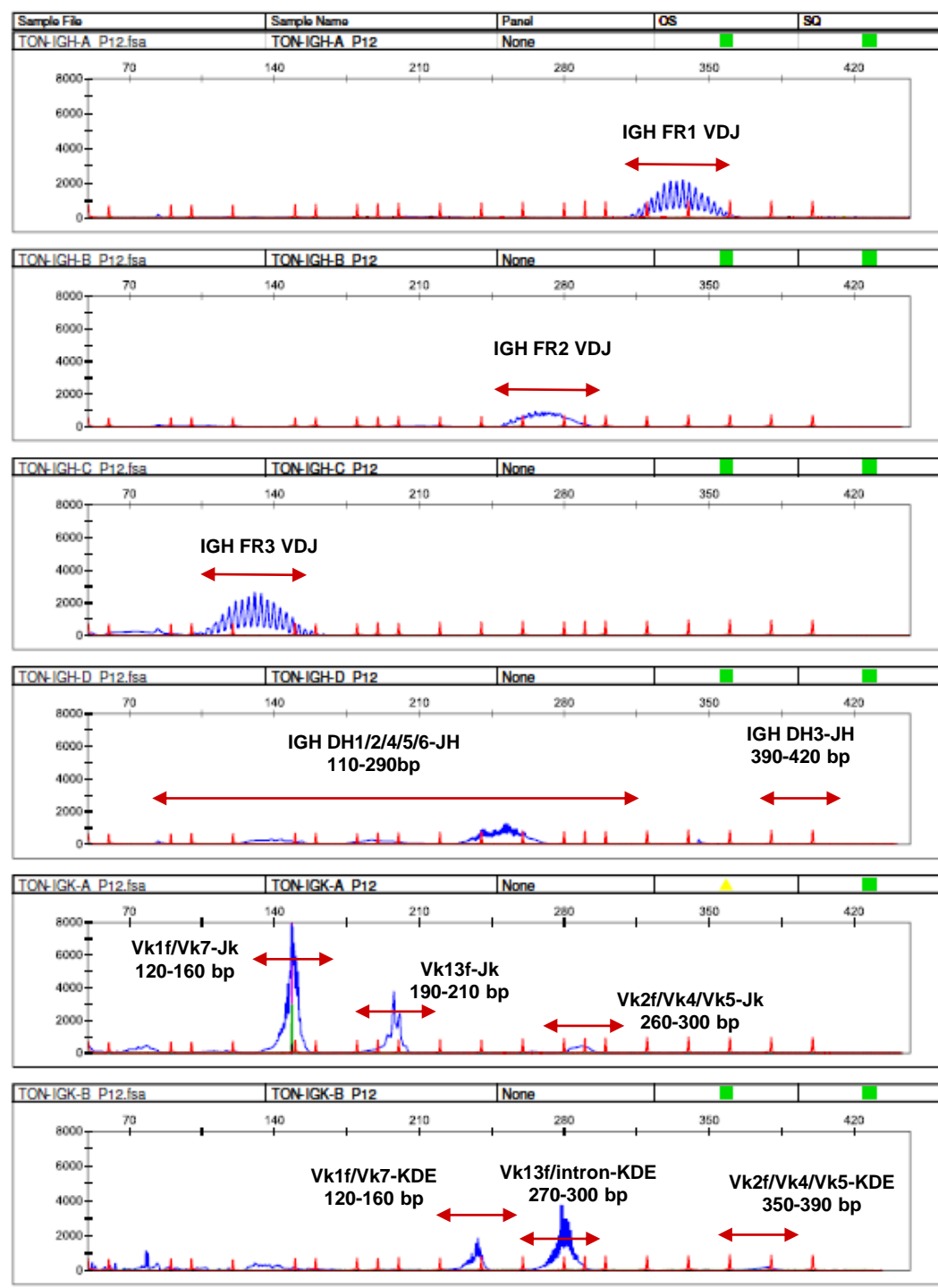


Interpretation of Clonality Analysis (IG and TR) in lymphoproliferative disorders

Voorwaarden voor goede interpretatie van klonaliteitsanalyses

- Goede kennis van de genetische opbouw van de IG en TR genherschikkingen
- Goede kennis van de setup van de verschillende PCR-reacties en de mogelijke technische pitfalls:
 - effect van staalkwaliteit
 - effect van analyse settings
 - specifieke pieken
 - effect van somatische hypermutatie bij IGH
 - verschillende pieken van zelfde herschikking
 - Cross-annealing van primers
- Goede kennis van het normale B- of T-cel repertoire in verschillende weefsels



Europese Richtlijn (Langerak et al., Leukemia 2012)

DUTCH LANGUAGE TABLES

Europese richtlijn voor interpretatie en rapportage van Ig / TCR klonaliteitsanalyses bij verdachte lymfoproliferaties

Anton W. Langerak¹, Patricia J.T.A. Groenen²

¹ Dept. of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

² Dept. of Pathology, Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

Original publication

EuroClonality / BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations.

Anton W. Langerak *, Patricia J.T.A. Groenen, Monika Brüggemann, Kheira Beldjord, Cristiana Bellan, Lisa Bonello, Elke Boone, Ian Carter, Mark Catherwood, Frederic Davi, Marie-Hélène Delfau-Larue, Tim Diss, Paul A.S. Evans, Paula Gameiro, Ramon Garcia Sanz, David Gonzalez, David Grand, Åsa Håkansson, Michael Hummel, Hongxiang Liu, Luis Lombardia, Elizabeth A. Macintyre, Ben Milner, Santiago Montes-Moreno, Ed Schuurin, Marcel Spaargaren, Elizabeth Hodges, Jacques J.M. van Dongen

Leukemia 2012;26:2159-2172; * a.langerak@erasmusmc.nl

1

When using these Tables, please refer to www.euroclonality.org and to the original publication in which the English version of the Tables is published: Langerak AW, et al., *Leukemia* 2012;26:2159-2172

Europese Richtlijn (Langerak et al., Leukemia 2012)

Tabel 3 Typische Ig / TCR patronen bij verschillende immunobiologische condities

Immunobiologische conditie	Voorbeelden	Verwacht patroon
- geen lymfocyten	- niet-hematopoietisch weefsel	- geen pieken / banden, zonder achtergrond ^a
- weinig lymfocyten	- klein infiltraat, klein monster (bijv. huid)	- (kleine) pieken / banden, <u>niet reproduceerbaar</u>
- (immuun)activatie met dominante klonen	- dominante immuunrespons (bijv. infectie, autoimmunitet)	- (meerdere) pieken / banden, <u>reproduceerbaar</u>
- reactieve lymfocyten	- brede immuunrespons	- (irregulaire) Gausse curve / smeer
- monoklonaliteit (mono-/bi-allelisch)	- leukemie, lymfoom, (kloon zonder duidelijke betekenis) ^b	- 1 of 2 pieken / banden ^c
- monoklonaliteit + polyklonale achtergrond	- idem, (kleine) kloon temidden van normale / reactieve lymfocyten ^b	- 1 of 2 pieken / banden ^c + Gausse curve / smeer
- monoklonaliteit (somatisch gemuteerd)	- idem, (post-)folliculaire B-celproliferatie	- geen pieken / banden ^d (of Gausse curve / smeer) ^a

^a Niet-specifieke piek(en) / banden kunnen aanwezig zijn

^b Kloon zonder duidelijke betekenis wordt meestal gezien bij situaties met enige achtergrond van polyklonale cellen

^c Aantal pieken / banden is afhankelijk van competitie in PCR reactie; In geval van IGK en TCRB loci kunnen tot 4 producten detecteerbaar zijn binnen 1 kloon.

^d Betreft vals-negatief resultaat

Interpretatie per tube

Tabel 4 EuroClonality uniform scoringsysteem m.b.t. technische beschrijving

<i>Type patron per tube (in duplo)</i>	<i>Technische beschrijving per tube</i>	<i>Optioneel: meer gedetailleerde technische beschrijving^a</i>
- geen pieken / banden (maar: slechte DNA kwaliteit)	- geen (<u>specifiek</u>) product, slecht DNA	
-geen pieken / banden (zonder achtergrond)	- geen (<u>specifiek</u>) product	- <u>niet-specifiek</u> product (... nt)
- 1 of 2 <u>reproduceerbare</u> klonale pieken / banden ^b	- klonaal (...nt)	- zwak klonaal (... nt) - klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)
- 1 of 2 <u>niet-reproduceerbaar</u> (duidelijke) pieken / banden ^b	- pseudoklonaal	
- meerdere (n ≥3) <u>niet-reproduceerbare</u> pieken / banden ^b	- meerdere producten	
- meerdere (n ≥3) <u>reproduceerbare</u> pieken / banden ^b	- meerdere producten (n=...) (...nt)	
- Gausse curve / smeer ^c (met of zonder kleine reproduceerbare pieken / banden ^b)	- polyklonaal (niet klonaal ^c)	- onregelmatig polyklonaal (niet klonaal ^c)
- patroon dat niet past bij de bovenstaande beschrijvingen	- niet te beoordelen ^d	

Afkortingen: nt, nucleotide

^a Meer gedetailleerde technische beschrijving opties kunnen door de gebruiker worden aangevuld; enkele mogelijke voorbeelden zijn aangegeven

^b Bij HD analyse komt aantal banden en aantal PCR producten niet noodzakelijkerwijs overeen, omdat extra heteroduplexen tussen producten kunnen worden gevormd

^c Bij HD analyse kan een polyklonale smeer minder goed detecteerbaar zijn, ondanks specifiek product in de agarose gel; dit wordt gescoord als "niet klonaal"

^d In minder dan 5% van de PCR resultaten geen goede technische beschrijving mogelijk

Finale moleculaire interpretatie (alle tuben samen)

Tabel 5 EuroClonality uniform scoringsysteem m.b.t. moleculaire conclusie

<i>Overall technische beschrijving Ig/TCR</i>	<i>Moleculaire interpretatie / conclusie</i>	<i>Optioneel: meer gedetailleerde moleculaire interpretatie^a</i>
- geen (<u>specifiek</u>) product, slecht DNA	- niet te beoordelen, vanwege slechte DNA kwaliteit	
- geen (<u>specifiek</u>) product	- geen herschikkingen in Ig/ TCR targets detecteerbaar	
- klonaal (...nt) ^f	- klonaliteit detecteerbaar	- klonaliteit detecteerbaar (bivalente producten) - klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit) - klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product) - klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product) - klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster) - klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond
- pseudoklonaal / meerdere <u>niet-reproduceerbare</u> producten	- geen klonaliteit detecteerbaar, passend bij geringe hoeveelheid template	
- meerdere <u>reproduceerbare</u> producten (n≥3) ^b	- oligoklonaliteit / meerdere klonen detecteerbaar	- dominante kloon in oligo/polyklonale achtergrond
- polyklonaal (niet klonaal ^c)	- polyklonaliteit detecteerbaar (geen klonaliteit detecteerbaar ^c)	- polyklonaliteit detecteerbaar plus kleine kloon zonder duidelijke betekenis ^d
- niet te beoordelen	- niet te beoordelen ^e	

^a Meer gedetailleerde moleculaire interpretatie opties kunnen door de gebruiker worden aangevuld; enkele mogelijke voorbeelden zijn aangegeven

^b In geval van IGK en TCRB loci kunnen tot 4 producten detecteerbaar zijn binnen 1 kloon

^c Bij HD analyse kan een polyklonale smeer minder goed detecteerbaar zijn, ondanks specifiek product in de agarose gel; dit wordt gescoord als "niet klonaal"

^d Voor gevallen met kleine reproduceerbare pieken / banden in een polyklonale achtergrond

^e In minder dan 5% van de gevallen geen goede moleculaire interpretatie mogelijk

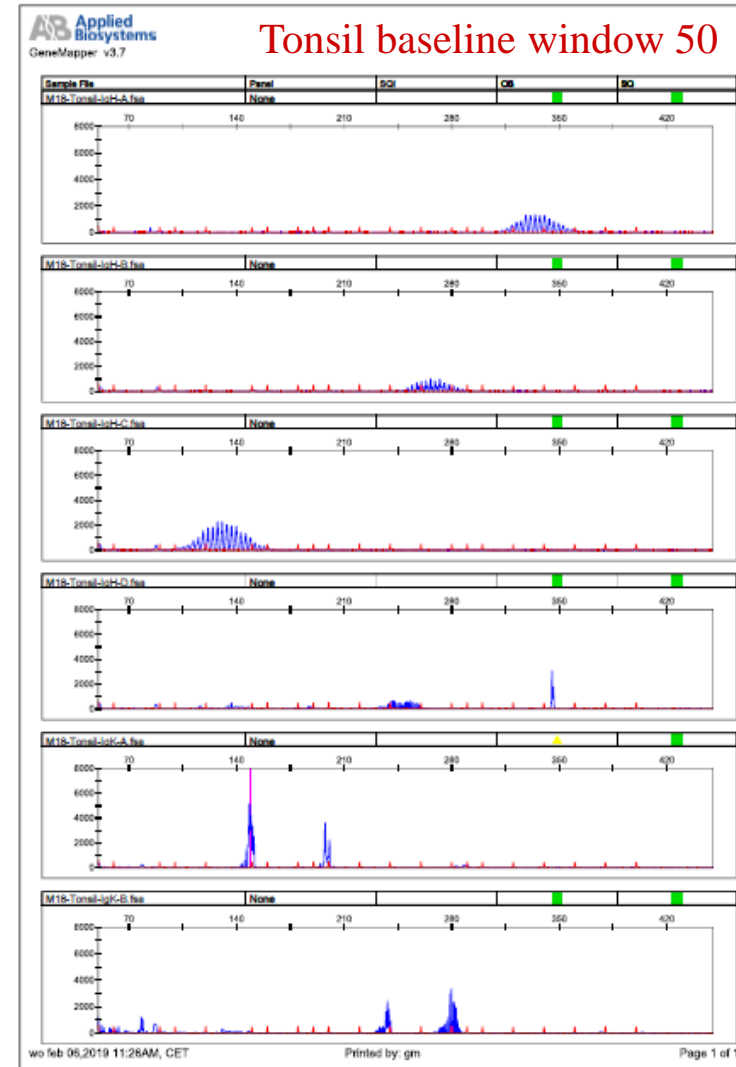
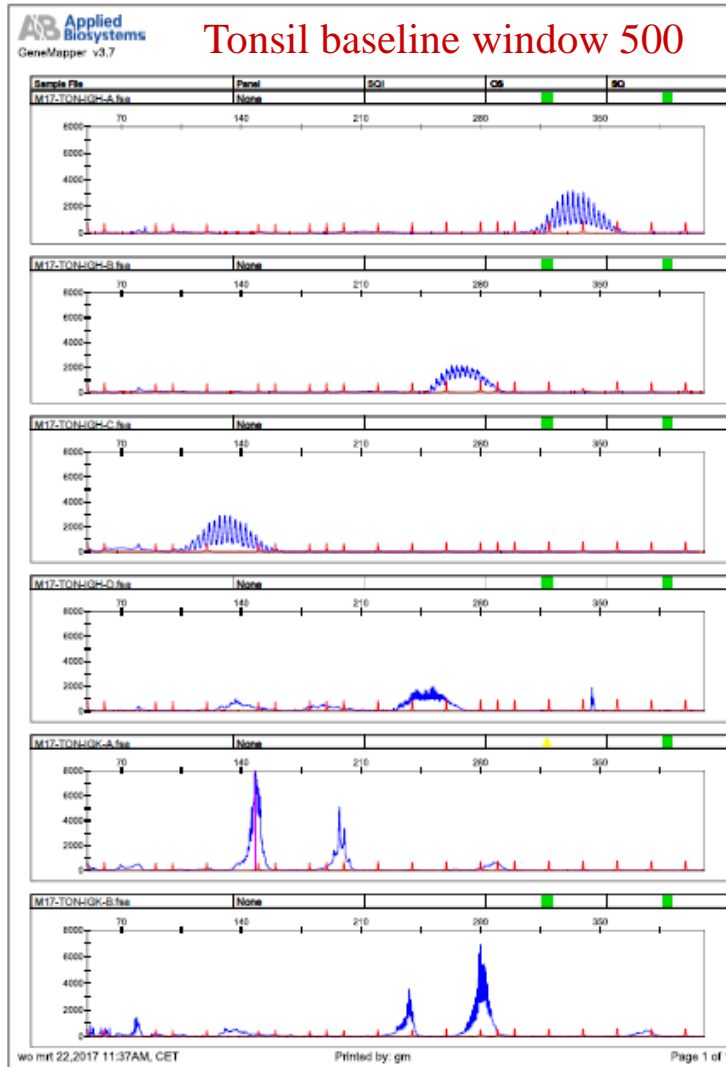
^f Klonale pieken / banden hoeven niet noodzakelijkerwijs in elk Ig/TCR target aanwezig te zijn om tot de moleculaire conclusie "klonaliteit gedetecteerd"

Interpretatie per tube invloed analyse settings of toestel!

- Gausse curve / smeer^c (met of zonder kleine reproduceerbare pieken / banden^b)

- polykloonaal (niet klonaal^c)

- onregelmatig polykloonaal (niet klonaal^c)

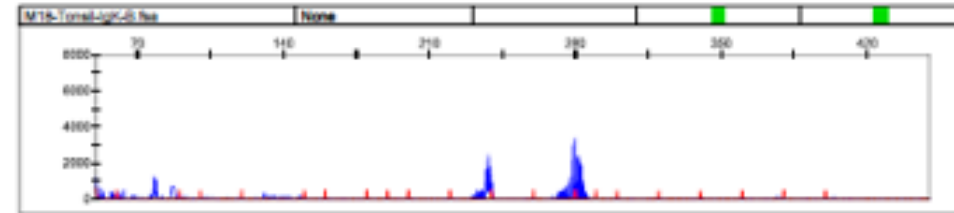
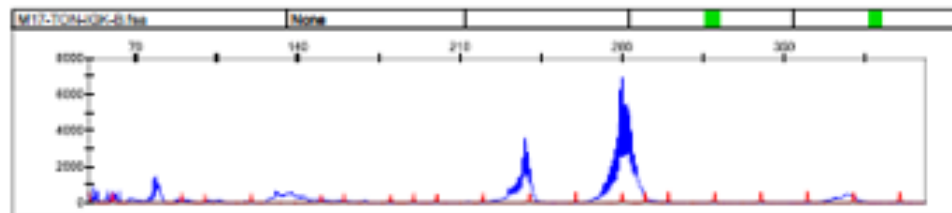
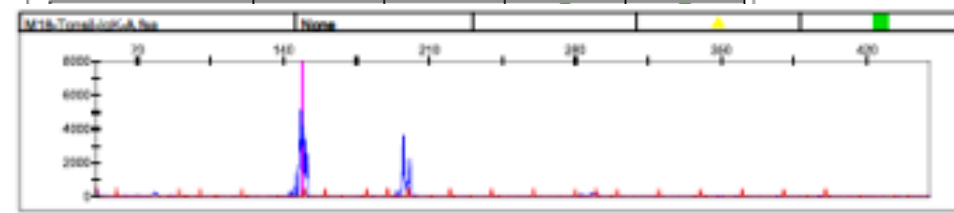
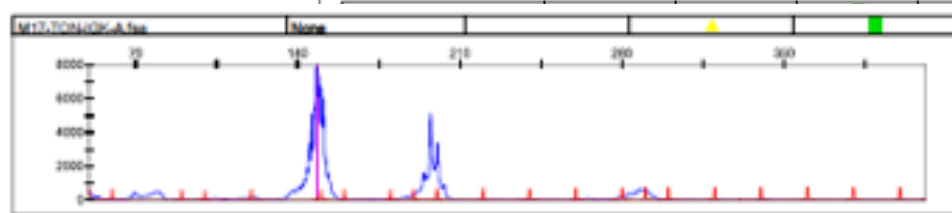
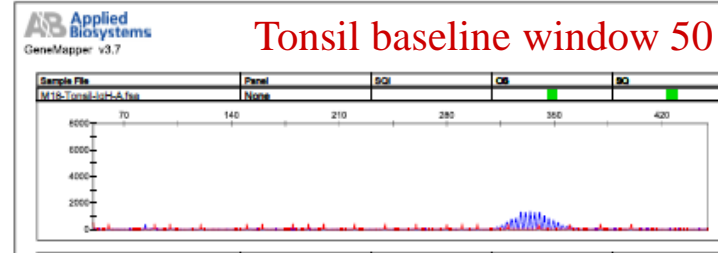
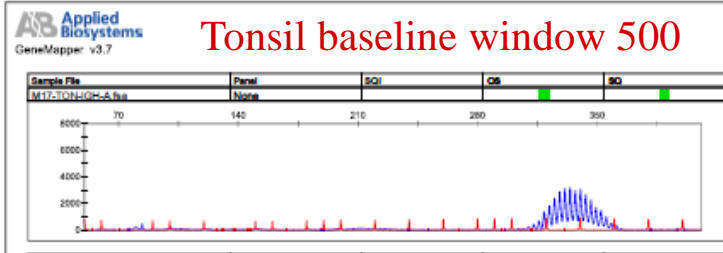


Interpretatie per tube invloed analyse settings of toestel!

- Gausse curve / smeer^c (met of zonder kleine reproduceerbare pieken / banden^b)

- polykloonaal (niet klonaal^c)

- onregelmatig polykloonaal (niet klonaal^c)



wo mrt 22,2017 11:37AM, CET

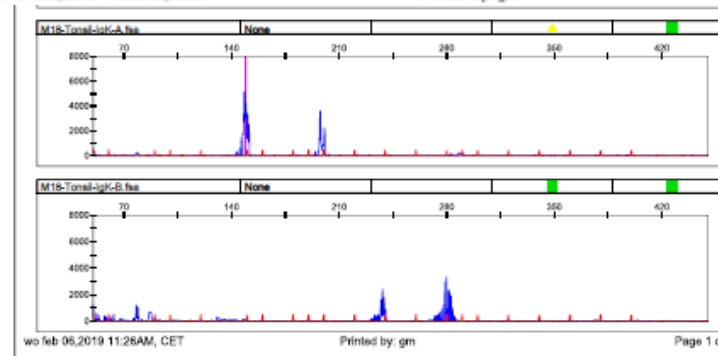
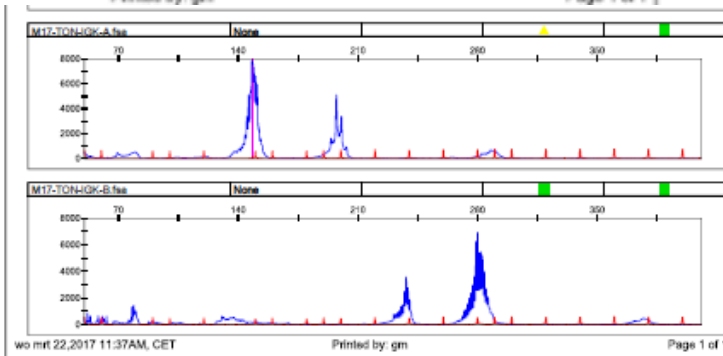
Printed by: gm

Page 1 of 1

wo feb 06,2019 11:26AM, CET

Printed by: gm

Page 1 of 1



wo mrt 22,2017 11:37AM, CET

Printed by: gm

Page 1 of 1

wo feb 06,2019 11:26AM, CET

Printed by: gm

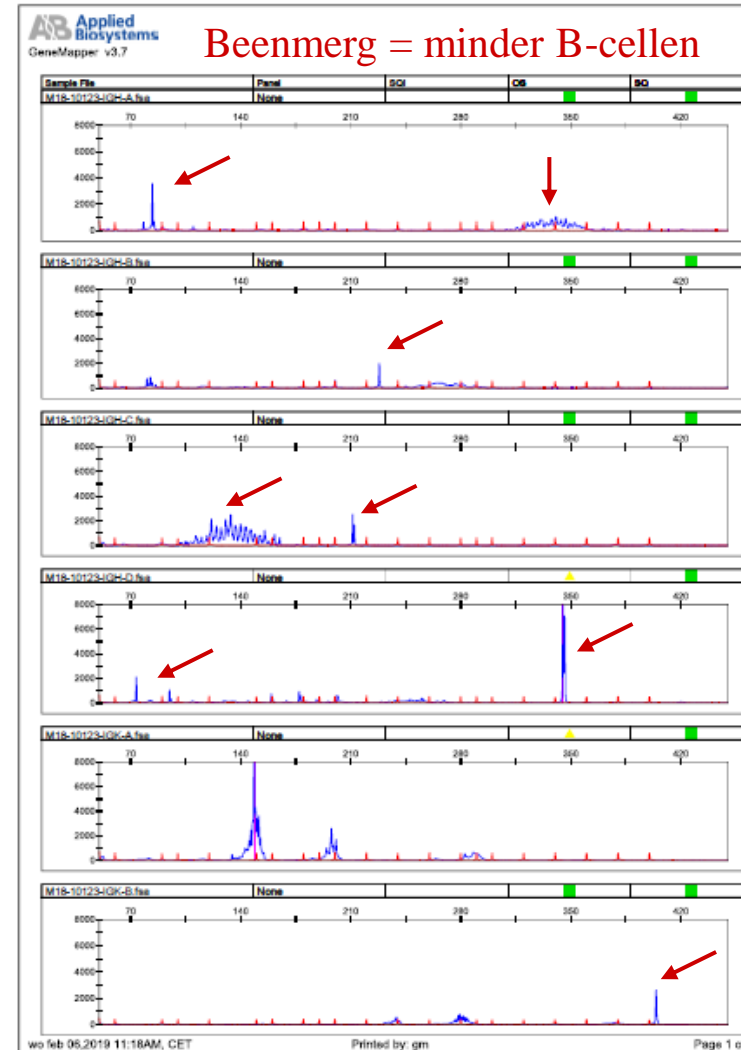
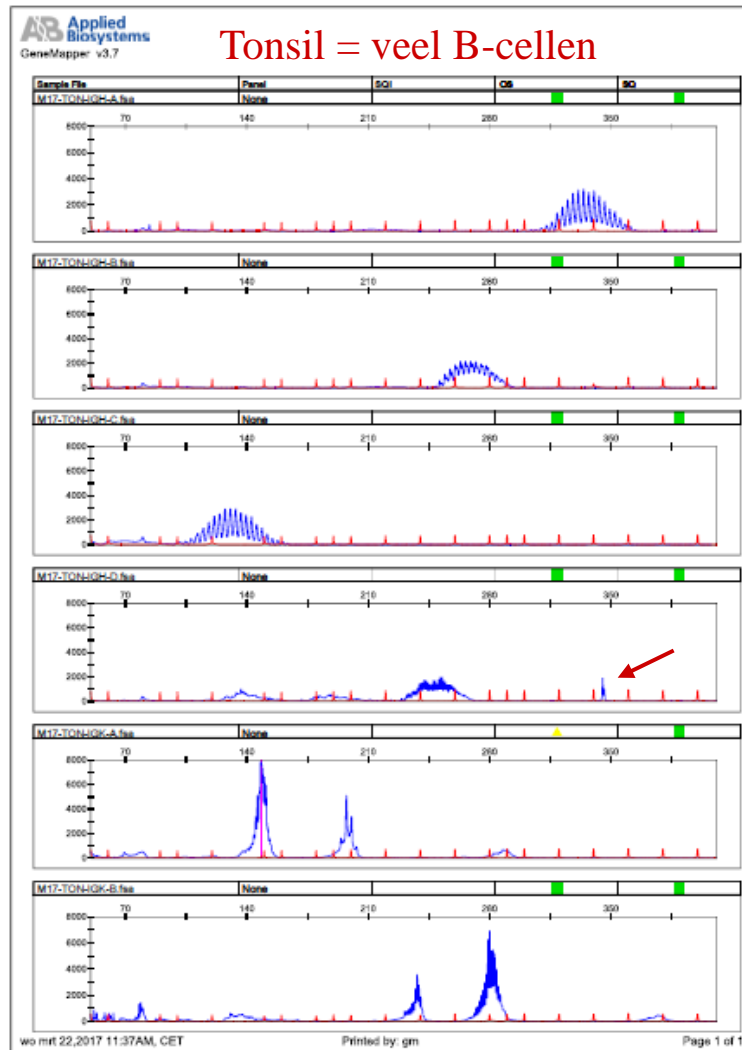
Page 1 of 1

Interpretatie per tube: polyklonaal (niet klonaal)

- Gausse curve / smeer^c (met of zonder kleine reproduceerbare pieken / banden^b)

- polyklonaal (niet klonaal^c)

- onregelmatig polyklonaal (niet klonaal^c)



Zwakker, minder mooi PC beeld

Onregelmatig of gewoon polyklonaal

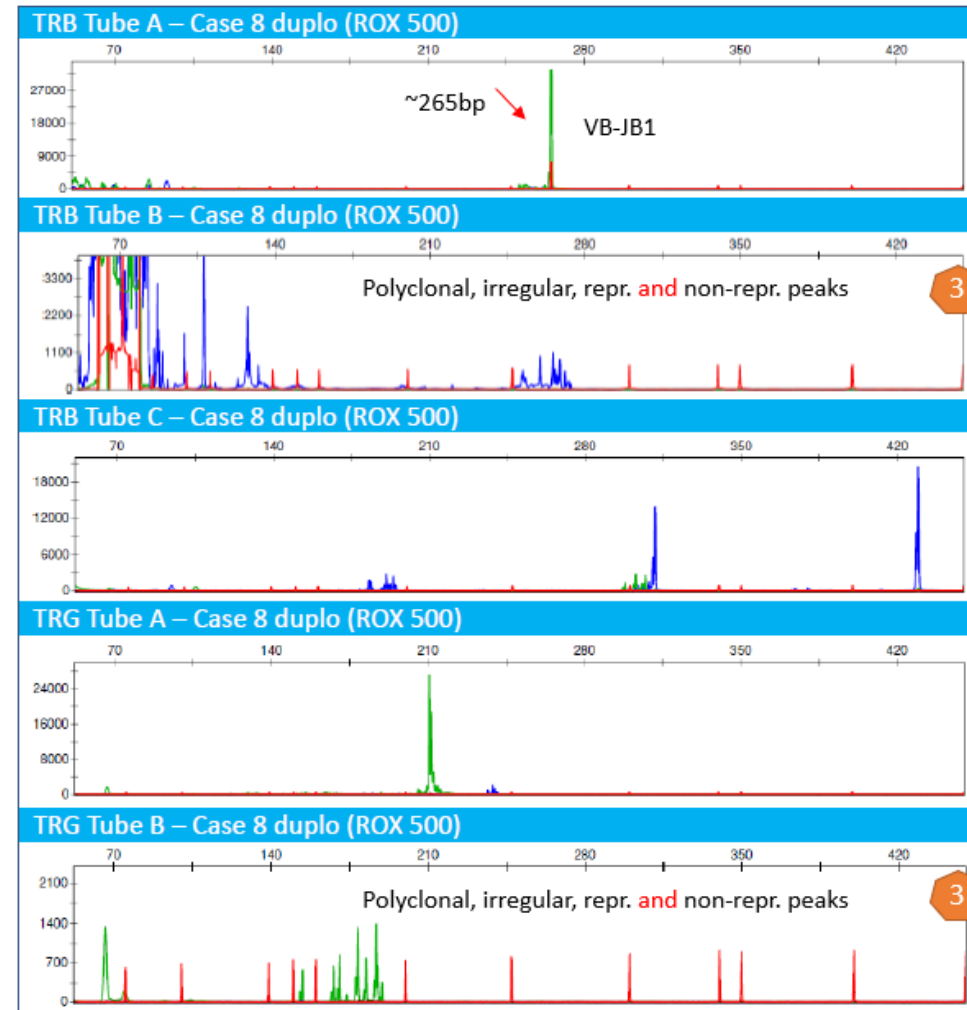
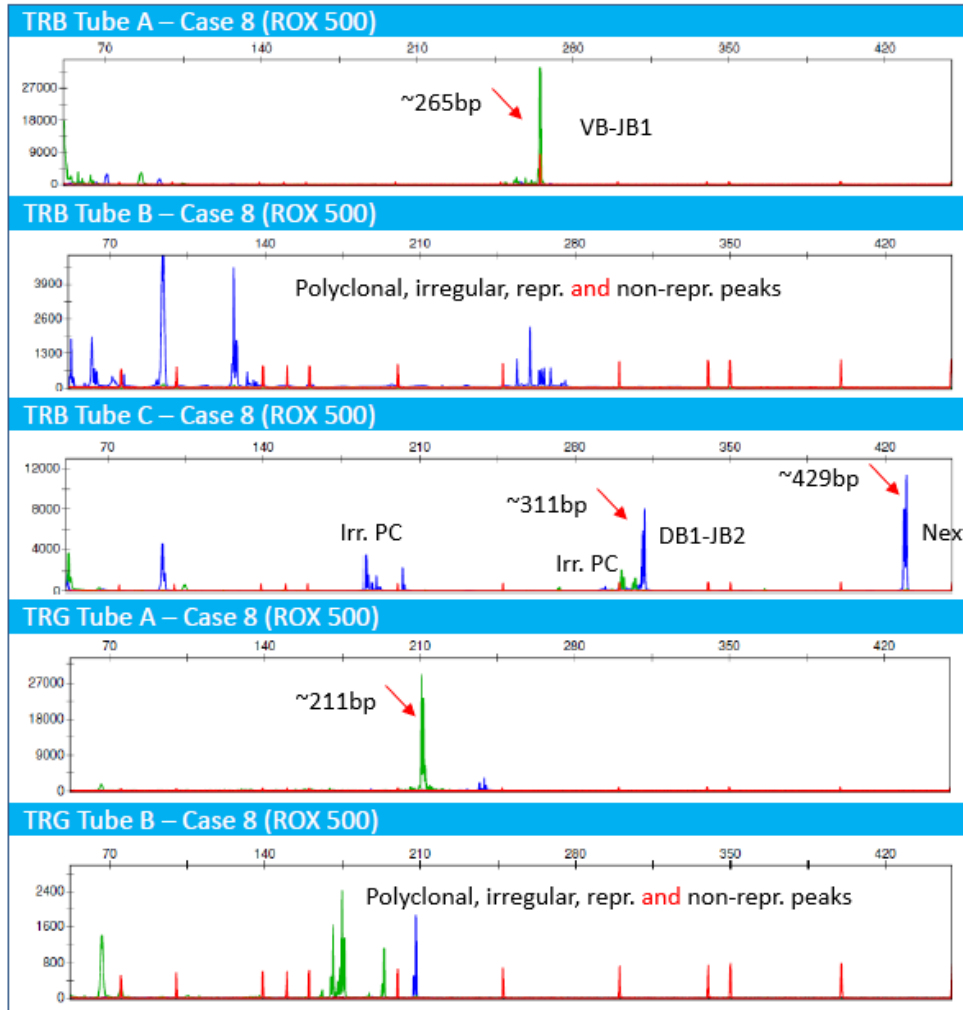
'Flavor of the LAB'

Interpretatie per tube: polyklonaal (niet klonaal)

- Gausse curve / smeer^c (met of zonder kleine reproduceerbare pieken / banden^b)

- polyklonaal (niet klonaal^c)

- onregelmatig polyklonaal (niet klonaal^c)

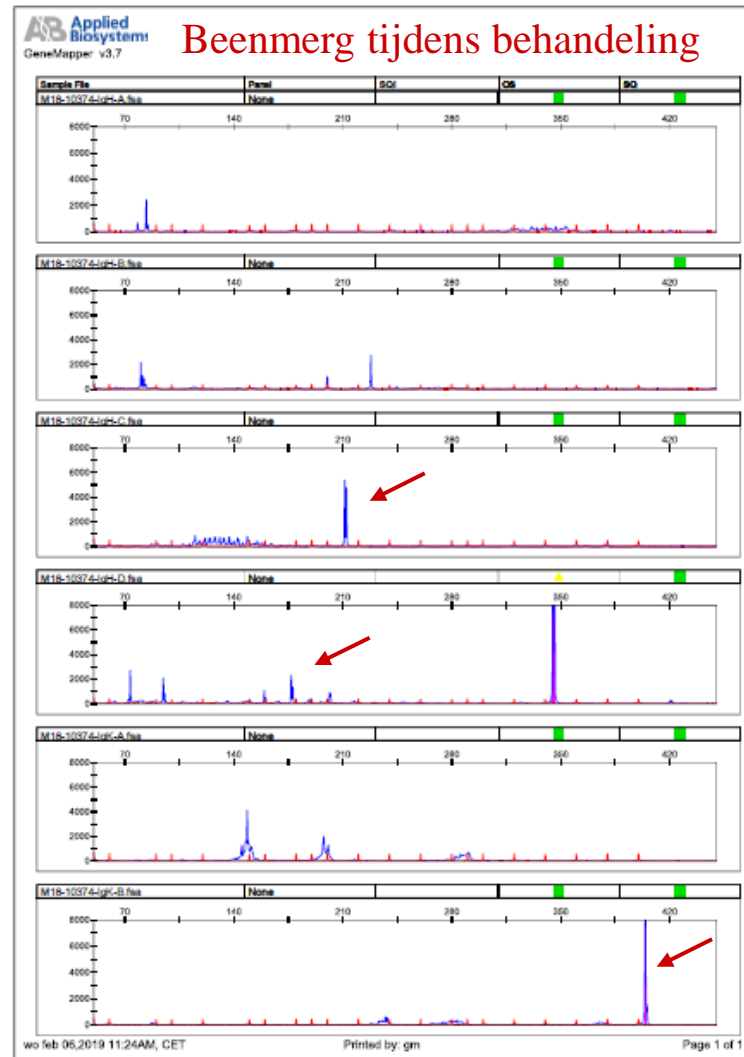
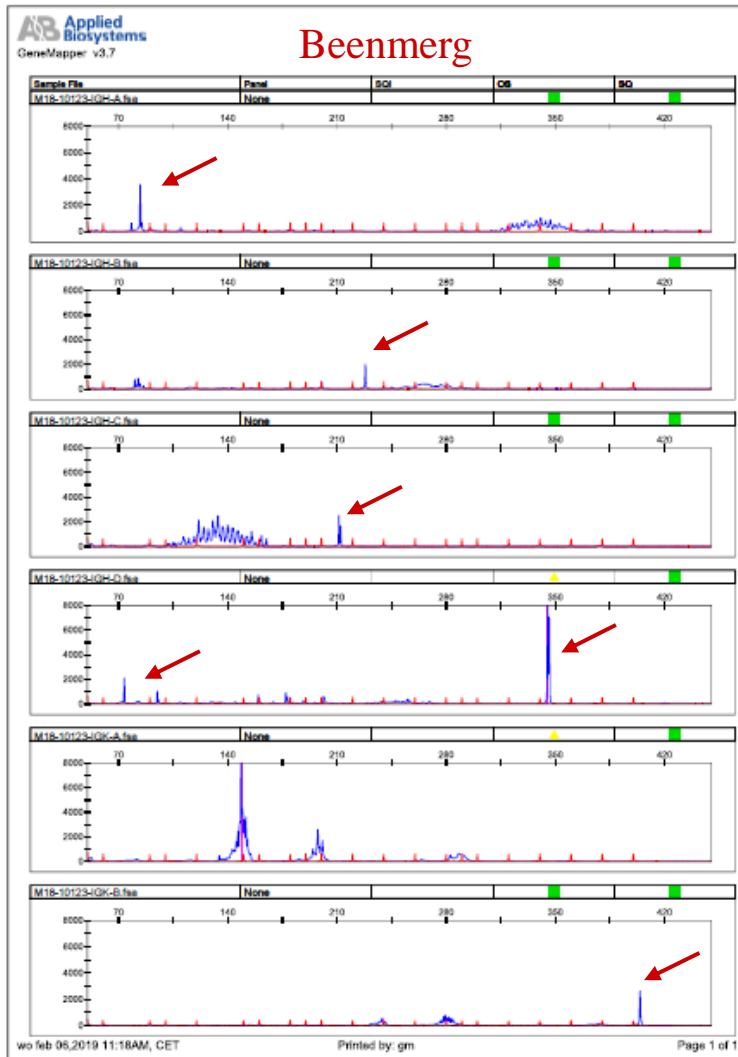


Interpretatie per tube: polyklonaal (niet klonaal)

- Gausse curve / smeer^c (met of zonder kleine reproduceerbare pieken / banden^b)

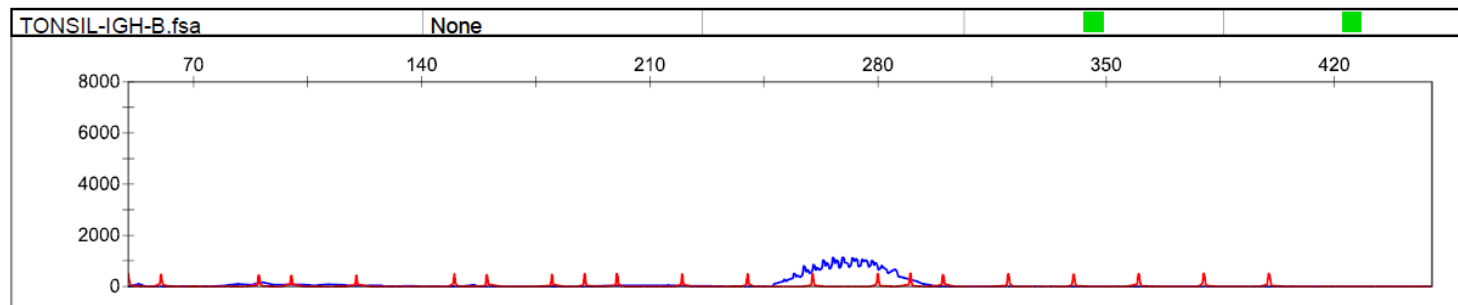
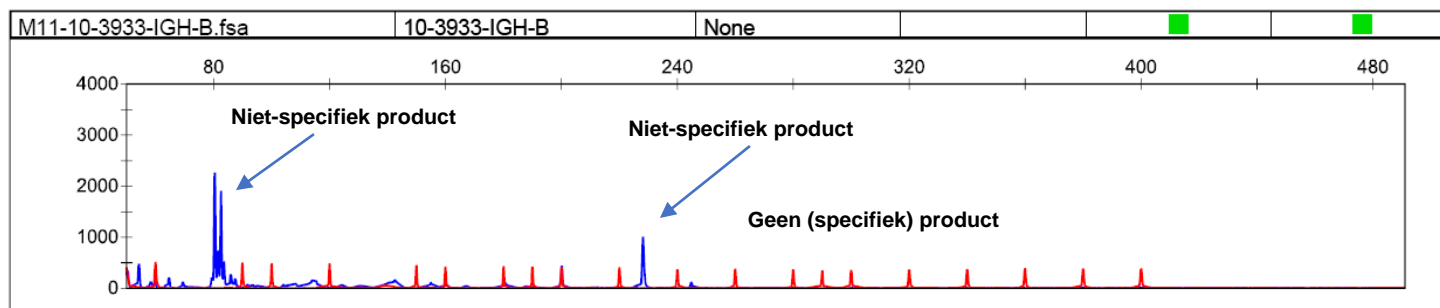
- polyklonaal (niet klonaal^c)

- onregelmatig polyklonaal (niet klonaal^c)



Interpretatie per tube: geen (specifiek) of niet-specifiek product

Type patron per tube (in duplo)	Technische beschrijving per tube	Optioneel: meer gedetailleerde technische beschrijving ^a
- geen pieken / banden (maar: slechte DNA kwaliteit)	- geen (specifiek) product, slecht DNA	
-geen pieken / banden (zonder achtergrond)	- geen (specifiek) product	- niet-specifiek product (... nt)



DNA maar geen B-cellen in staal

Niet-specifieke producten per tube identificeren/kennen

Type patron per tube (in duplo)	Technische beschrijving per tube	Optioneel: meer gedetailleerde technische beschrijving ^a
- geen pieken / banden (maar: slechte DNA kwaliteit)	- geen (specifiek) product, slecht DNA	
-geen pieken / banden (zonder achtergrond)	- geen (specifiek) product	- niet-specifiek product (... nt)

Table 1. Ig/TCR multiplex PCR: preferred method of analysis, expected size ranges and nonspecific bands^a

Multiplex PCR	Preferred method of analysis	Size range (nt)	Nonspecific bands (nt)
IGH V _H -J _H	GS and HD both suitable	Tube A: 310–360 Tube B: 250–295 Tube C: 100–170	Tube A: ~85 Tube B: ~228 ^b Tube C: ~211 ^b
IGH D _H -J _H	HD slightly preferred over GS (Amplicon variation hampers GS)	Tube D: 110–290 (D _H 1/2/4/5/6-J _H) 390–420 (D _H 3-J _H) Tube E: 100–130	Tube D: ~350 ^c Tube E: 211 ^d
IGK	GS and HD have complementary value (Small CDR3 + amplicon variation hamper GS)	Tube A: 120–160 (V _κ 1f/6/V _κ 7-J _κ) 190–210 (V _κ 3f-J _κ) 260–300 (V _κ 2f/V _κ 4/V _κ 5-J _κ) Tube B: 210–250 V _κ 1f/6/V _κ 7-Kde 270–300 (V _κ 3f/intron-Kde) 350–390 (V _κ 2f/V _κ 4/V _κ 5-Kde)	Tube A: ~217 ^b Tube B: ~404 ^b
IGL	HD slightly preferred over GS (Small CDR3 hampers GS)	Tube A: 140–165	Tube A:—
TCRB	GS and HD both suitable	Tube A: 240–285 Tube B: 240–285 Tube C: 170–210 (Dβ2) 285–325 (Dβ1)	Tube A: ~213 ^{b,e} , ~273 ^b Tube B: ~93, ~126, ~221 ^{b,e} Tube C: ~128, ~337 ^{b,e}
TCRG	GS and HD both suitable	Tube A: 145–255 Tube B: 80–220	Tube A:— Tube B:—
TCRD	HD slightly preferred over GS (Low template amount + amplicon variation hamper GS)	Tube A: 120–280	Tube A: ~90, ~123

Abbreviations: GS, GeneScan; HD, heteroduplex; Ig, immunoglobulin; IGH, IG heavy chain; IGK, IG kappa; IGL, IG lambda; nt, nucleotide; TCR, T-cell receptor; TCRB, TCR beta; TCRD, TCR delta; TCRG, TCR gamma. ^aUpdate of table 25 of earlier BIOMED-2/EuroClonality report. ^bParticularly seen in samples with low numbers of contaminating lymphoid cells. ^cNonspecific 350-bp band is the result of cross-annealing of the D_H2 primer to a sequence upstream of J_H4. In GeneScanning this nonspecific band does not comigrate with D–J products. ^dThe 211-bp PCR product represents product from germline D_H7–J_H1 region; when PCR amplification is very efficient, also longer PCR products might be obtained based on primer annealing to downstream J_H genes; for example, 419 bp (D_H7–J_H2), 1031 bp (D_H7–J_H3), and so on. ^eDetection of nonspecific band depends on quality of primers (batch-dependent).

Niet-specifieke producten per tube identificeren/kennen

Type patron per tube (in duplo)	Technische beschrijving per tube	Optioneel: meer gedetailleerde technische beschrijving ^a
- geen pieken / banden (maar: slechte DNA kwaliteit)	- geen (specifiek) product, slecht DNA	
-geen pieken / banden (zonder achtergrond)	- geen (specifiek) product	- niet-specifiek product (... nt)

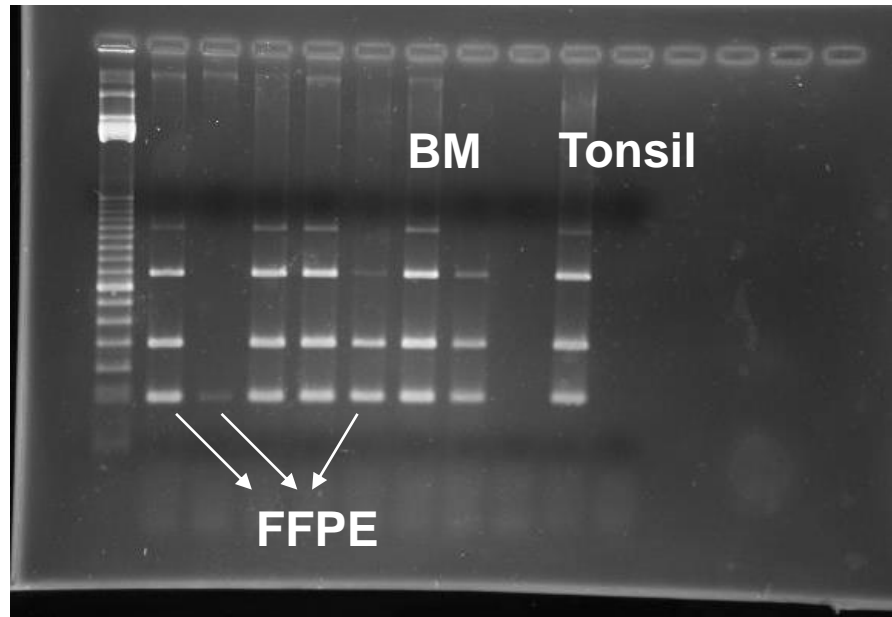
Table 1. Ig/TCR multiplex PCR: preferred method of analysis, expected size ranges and nonspecific bands^a

Multiplex PCR	Preferred method of analysis	Size range (nt)	Nonspecific bands (nt)
IGH V _H -J _H	GS and HD both suitable	Tube A: 310–360 Tube B: 250–295 Tube C: 100–170	Tube A: ~85 Tube B: ~228 ^b Tube C: ~211 ^b
IGH D _H -J _H	HD slightly preferred over GS	Tube D: 110–290 (D _H 1/2/4/5/6-J _H)	Tube D: ~350 ^c
TCRG	GS and HD both suitable	Tube C: 170–210 (Dβ2) 285–325 (Dβ1) Tube A: 145–255 Tube B: 80–220	Tube C: ~128, ~337 ^{b,e} Tube A:— Tube B:—
TCRD	HD slightly preferred over GS (Low template amount + amplicon variation hamper GS)	Tube A: 120–280	Tube A: ~90, ~123

Abbreviations: GS, GeneScan; HD, heteroduplex; Ig, immunoglobulin; IGH, IG heavy chain; IGK, IG kappa; IGL, IG lambda; nt, nucleotide; TCR, T-cell receptor; TCRB, TCR beta; TCRD, TCR delta; TCRG, TCR gamma. ^aUpdate of table 25 of earlier BIOMED-2/EuroClonality report.¹⁵ ^bParticularly seen in samples with low numbers of contaminating lymphoid cells. ^cNonspecific 350-bp band is the result of cross-annealing of the D_H2 primer to a sequence upstream of J_H4. In GeneScanning this nonspecific band does not comigrate with D–J products. ^dThe 211-bp PCR product represents product from germline D_H7–J_H1 region; when PCR amplification is very efficient, also longer PCR products might be obtained based on primer annealing to downstream J_H genes; for example, 419 bp (D_H7–J_H2), 1031 bp (D_H7–J_H3), and so on. ^eDetection of nonspecific band depends on quality of primers (batch-dependent).

Belang van goede DNA kwaliteit (400bp) en correcte DNA input

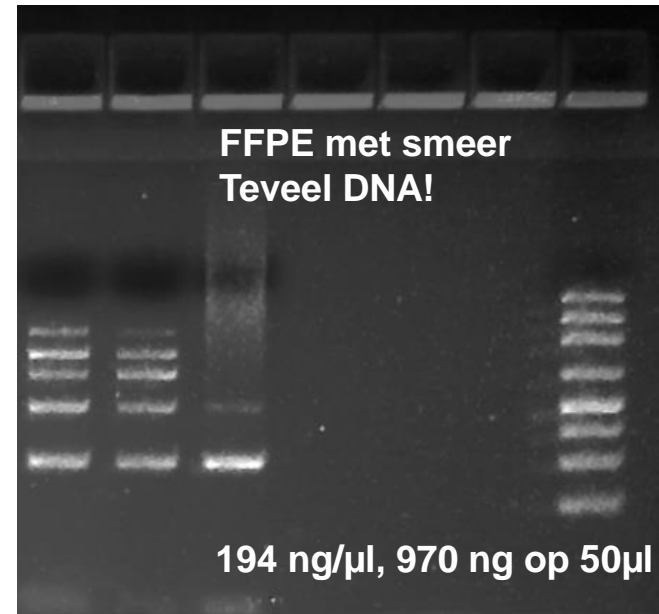
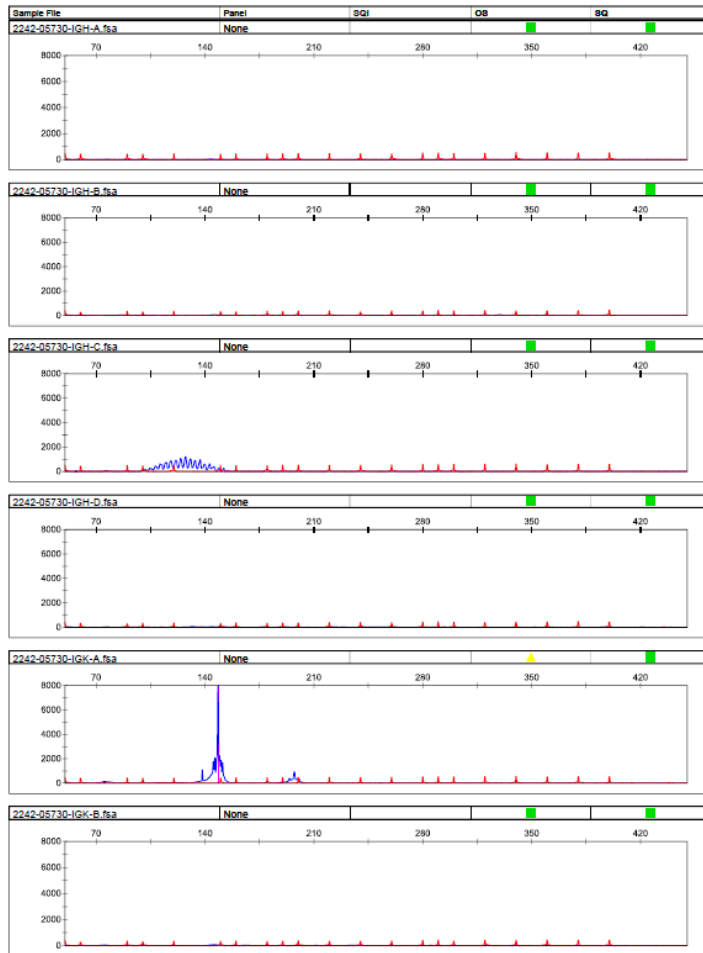
Type patron per tube (in duplo)	Technische beschrijving per tube	Optioneel: meer gedetailleerde technische beschrijving ^a
- geen pieken / banden (maar: slechte DNA kwaliteit)	- geen (<u>specifiek</u>) product, slecht DNA	
-geen pieken / banden (zonder achtergrond)	- geen (<u>specifiek</u>) product	- <u>niet-specifiek</u> product (... nt)



Degradatie van DNA door formaline fixatie

Geen (specifiek) product, slechte DNA kwaliteit

Type patron per tube (in duplo)	Technische beschrijving per tube	Optioneel: meer gedetailleerde technische beschrijving ^a
- geen pieken / banden (maar: slechte DNA kwaliteit)	- geen (specifiek) product, slecht DNA	
-geen pieken / banden (zonder achtergrond)	- geen (specifiek) product	- <u>niet-specifiek</u> product (... nt)



Geen (specifiek) product, slechte DNA kwaliteit

Type patron per tube (in duplo)

Technische beschrijving per tube

Optioneel: meer gedetailleerde technische beschrijving^a

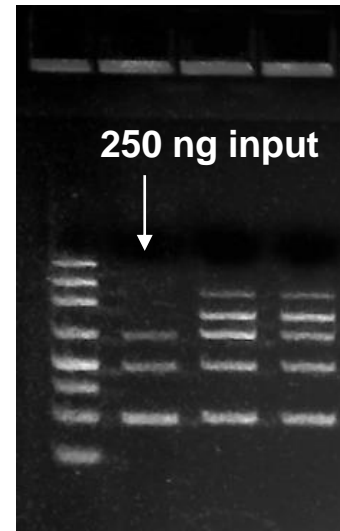
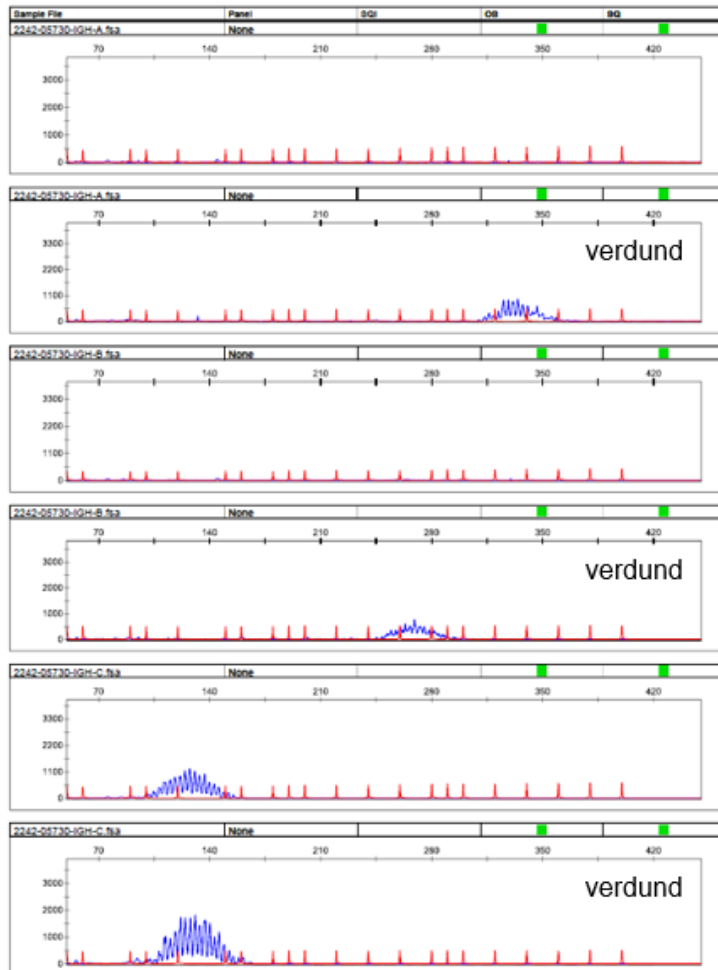
- geen pieken / banden (maar: slechte DNA kwaliteit)

- geen (specifiek) product, slecht DNA

-geen pieken / banden (zonder achtergrond)

- geen (specifiek) product

- niet-specifiek product (... nt)



Polyclonaal beeld onderdrukt door teveel DNA
Grotere PCR-producten gevoeliger aan inhibitie

Kleinere PCR-producten minder sterk bij teveel DNA

Indien 'ladder PCR' maar tot 100bp > slecht DNA

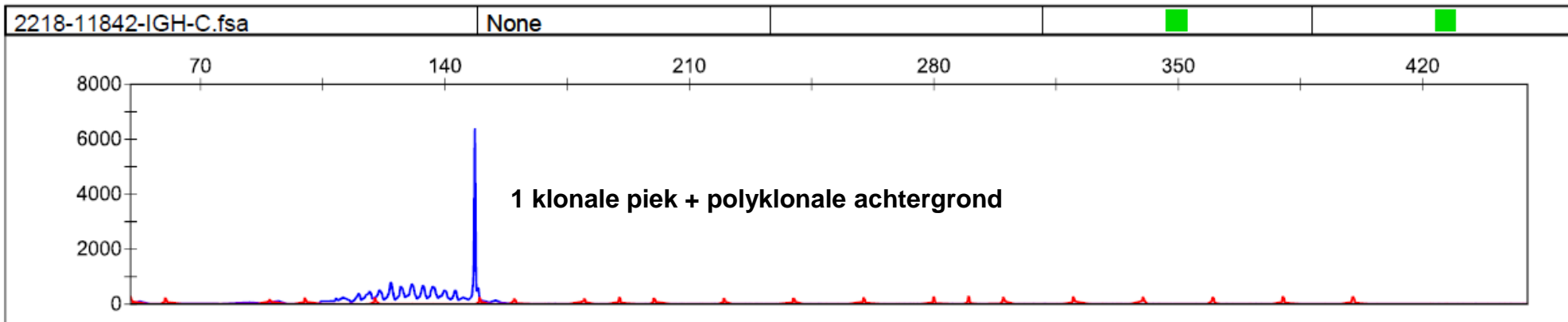
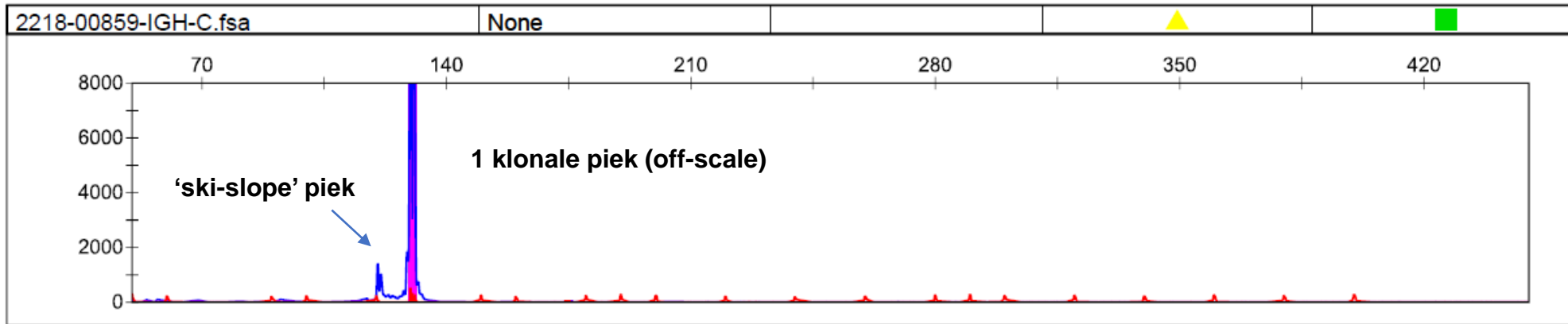
Altijd de oorzaak nakijken (FFPE en/of DNA hoeveelheid)

Bij gedegradieerd FFPE-DNA kan je dit niet meer goed krijgen

Analyse wel opstarten omdat je soms toch nog clonaliteit via de kleinere targets kan oppikken

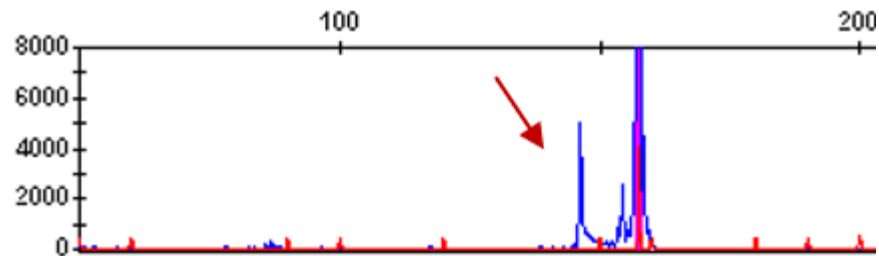
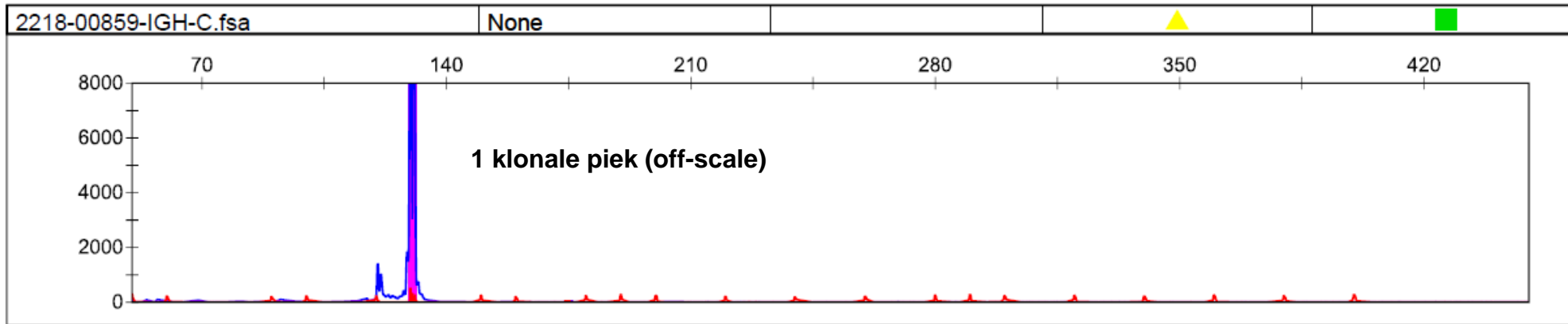
Interpretatie per tube: klonaal (zwak of + polyklonaal)

- 1 of 2 reproduceerbare klonale pieken / banden^b - klonaal (...nt) - zwak klonaal (... nt)
- klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)



Interpretatie per tube: definitie 'ski-slope' piek

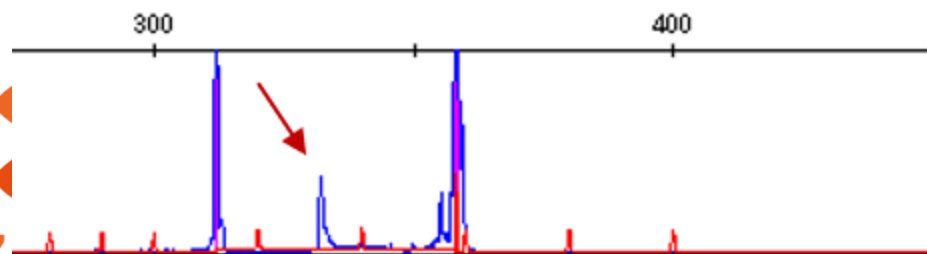
- 1 of 2 reproduceerbare klonale pieken / banden^b - klonaal (...nt) - zwak klonaal (... nt)
- klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)



Voor een off-scale piek

Vorm van ski-schans

Afstand tov off-scale piek is verschillend



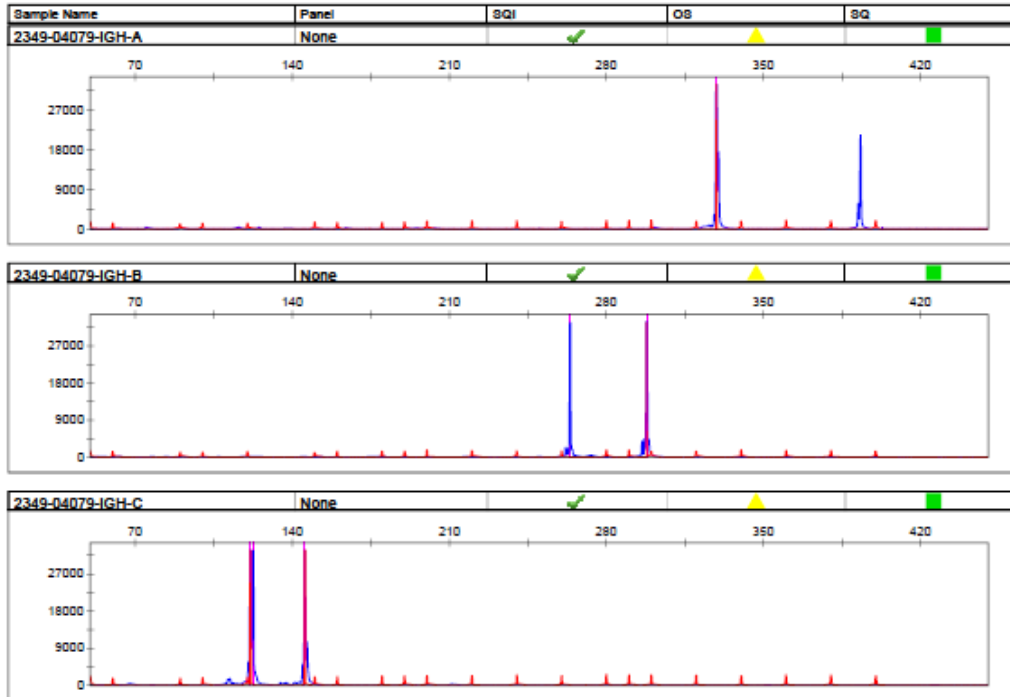
Oplossing staal verdunnen of minder PCR product op analyser

Interpretatie per tube: klonaal (zwak of + polyklonaal)

- 1 of 2 reproduceerbare klonale pieken / banden^b - klonaal (...nt)

- zwak klonaal (... nt)

- klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)



2 klonale pieken

Intensiteit kan verschillend zijn zelfs bij 1 kloon

Oorzaak: consensus primers, sommige VH segmenten hebben mutaties tov de primer

Afstand tussen pieken bij IGH VDJ kan verschillen, insertie/deletie

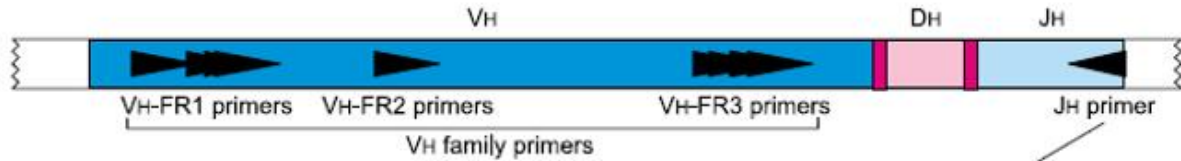


Interpretatie per tube: OUT-OF-RANGE pieken: somatische hypermutatie

- 1 of 2 reproduceerbare klonale pieken / banden^b - klonaal (...nt)

- zwak klonaal (... nt)

- klonaal (...nt) + polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)



IGH tube A

	5'		3'	3'	5'		JH consensus
Vh1-FR1 (1-2)	(-252)	GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG		CCAGTGGCAGAGGAGTCCATTC	(+57)		
Vh2-FR1 (2-5)	(-284)	GTCTGGTCTACGCTGGTGAACCC					
Vh3-FR1 (3-7)	(-256)	CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG					
Vh4-FR1 (4-4)	(-256)	CTTCGGAGACCCTGTCCTCACCTG					
Vh5-FR1 (5-51)	(-255)	CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT					
Vh6-FR1 (6-1)	(-263)	TGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG					

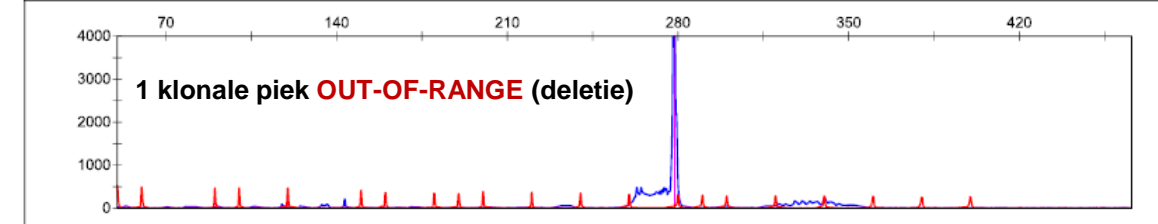
IGH tube B

Vh1-FR2 (1-2)	(-192)	CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA
Vh2-FR2 (2-5)	(-190)	TGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGG
Vh3-FR2 (3-7)	(-189)	GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA
Vh4-FR2 (4-4)	(-188)	TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG
Vh5-FR2 (5-51)	(-190)	GGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGG
Vh6-FR2 (6-1)	(-194)	TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAG
Vh7-FR2 (7)	(-192)	TTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA

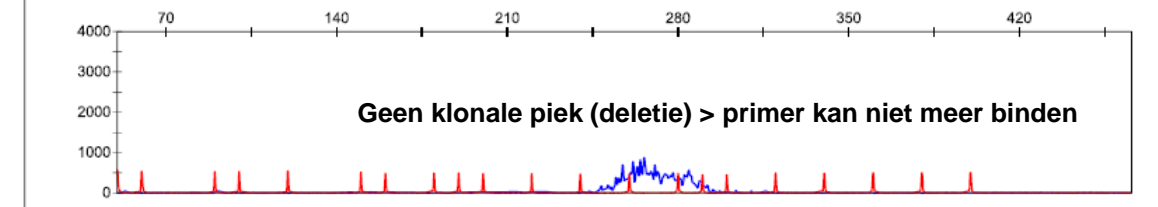
IGH tube C

Vh1-FR3 (1-2)	(-55)	TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA
Vh2-FR3 (2-5)	(-54)	CAATGACCAACATGGACCCTGTGGA
Vh3-FR3 (3-7)	(-57)	TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
Vh4-FR3 (4-4)	(-48)	GAGCTCTGTGACCGCCGCGGACAG
Vh5-FR3 (5-51)	(-69)	CAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGC
Vh6-FR3 (6-1)	(-63)	GTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTG
Vh7-FR3 (7)	(-69)	CAGCACGGCATATCTGCAGATCAG

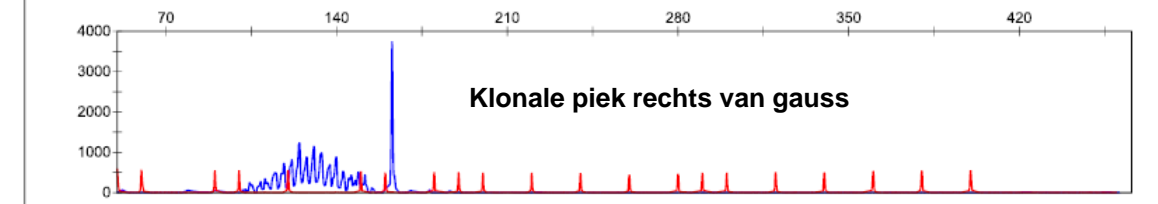
Sample File	Sample Name	Panel	SQI	OS	SQ
M11-11-0126-IgH-A.fsa	11-0126-IgH-A	None		▲	■



Sample File	Sample Name	Panel	SQI	OS	SQ
M11-11-0126-IgH-B.fsa	11-0126-IgH-B	None		■	■



Sample File	Sample Name	Panel	SQI	OS	SQ
M11-11-0126-IgH-C.fsa	11-0126-IgH-C	None		■	■

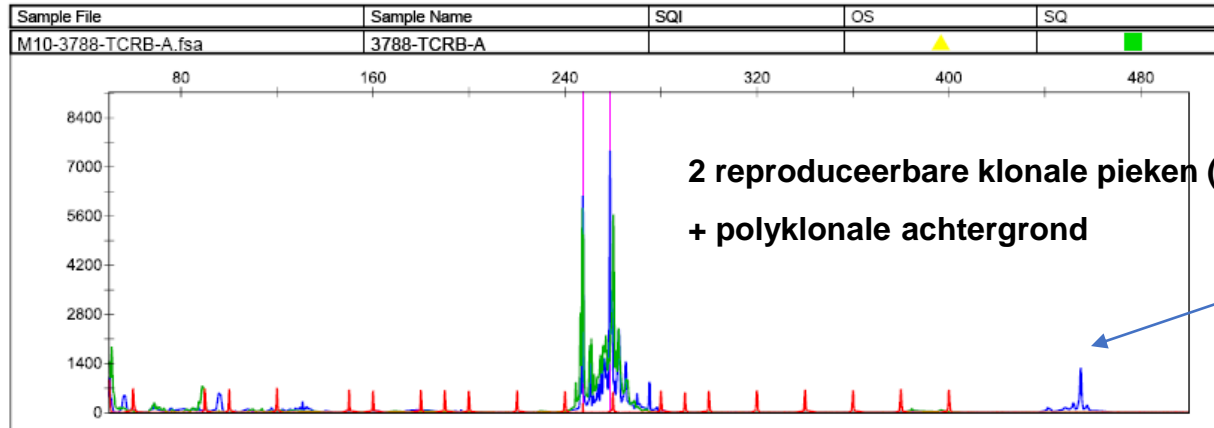


Interpretatie per tube: OUT-OF-RANGE pieken: volgende JH, JK of JB

- 1 of 2 reproduceerbare klonale pieken / banden^b - klonaal (...nt)

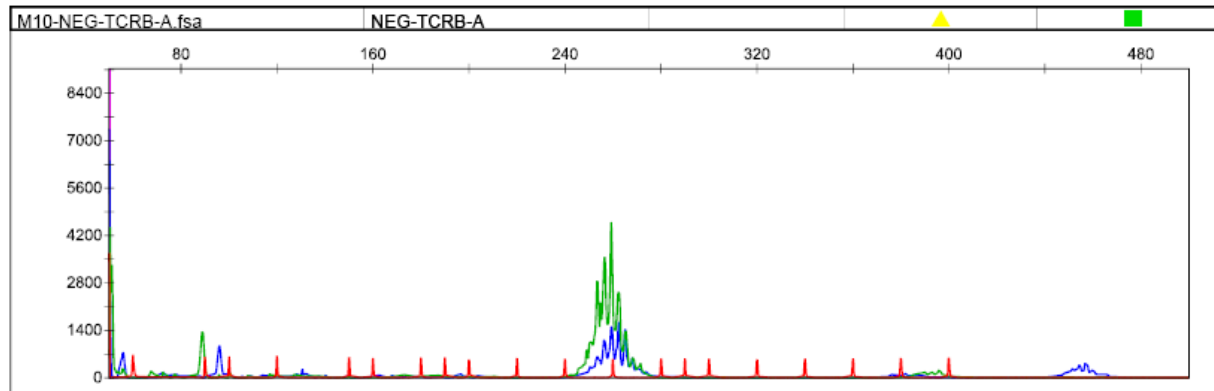
- zwak klonaal (... nt)

- klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)



2 reproduceerbare klonale pieken (off-scale)
+ polyklonale achtergrond

OUT-OF-RANGE piek? Insertie?

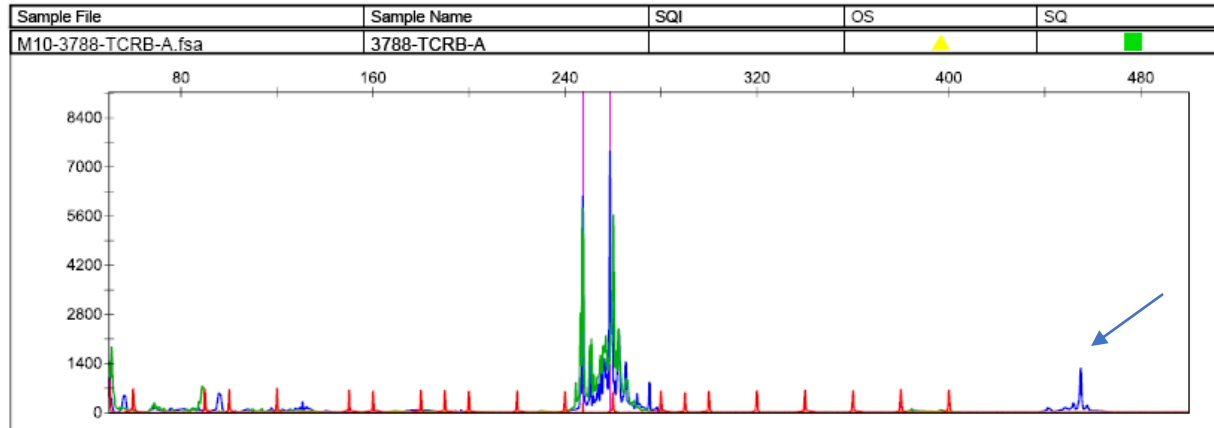


Interpretatie per tube: OUT-OF-RANGE pieken: volgende JH, JK of JB

- 1 of 2 reproduceerbare klonale pieken / banden^b - klonaal (...nt)

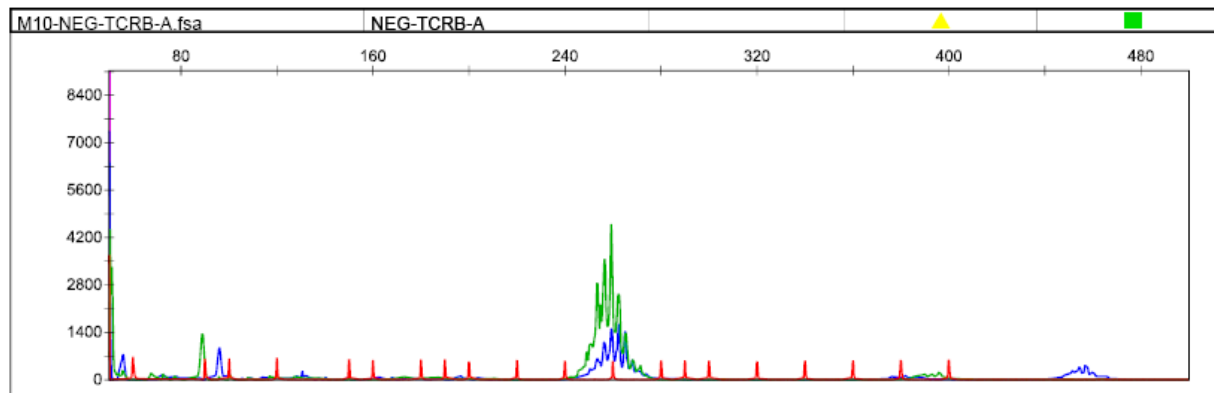
- zwak klonaal (... nt)

- klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)



OUT-OF-RANGE piek? Insertie? NEE!

Primer binding op volgende JB segment > extra piek, zelfde herschikt gen

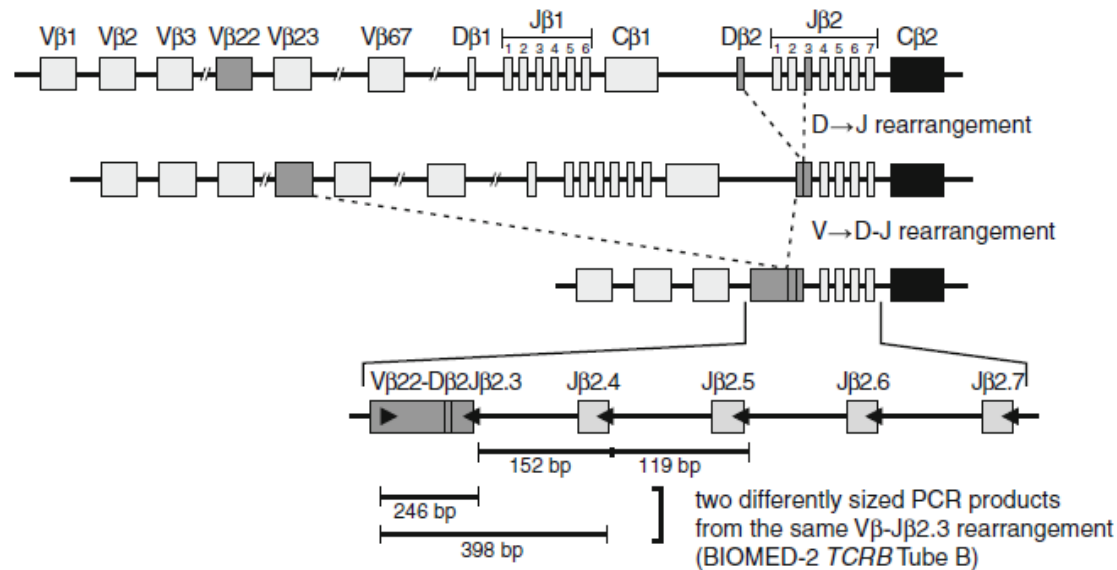


Interpretatie per tube: OUT-OF-RANGE pieken: volgende JH, JK of JB

- 1 of 2 reproduceerbare klonale pieken / banden^b - klonaal (...nt)

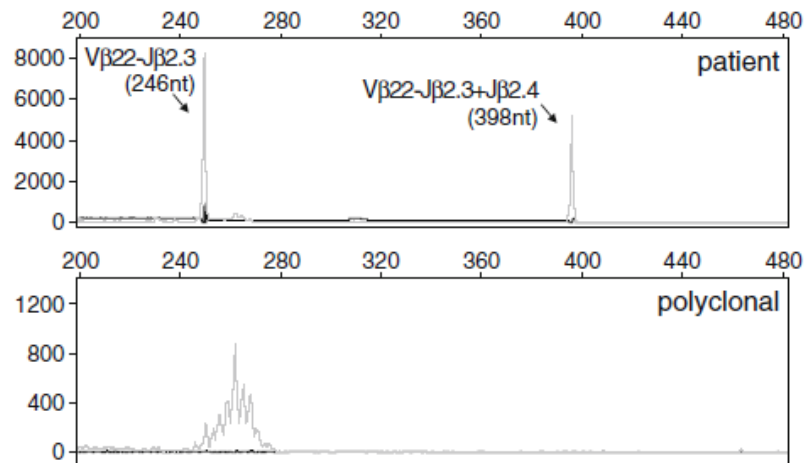
- zwak klonaal (... nt)

- klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)



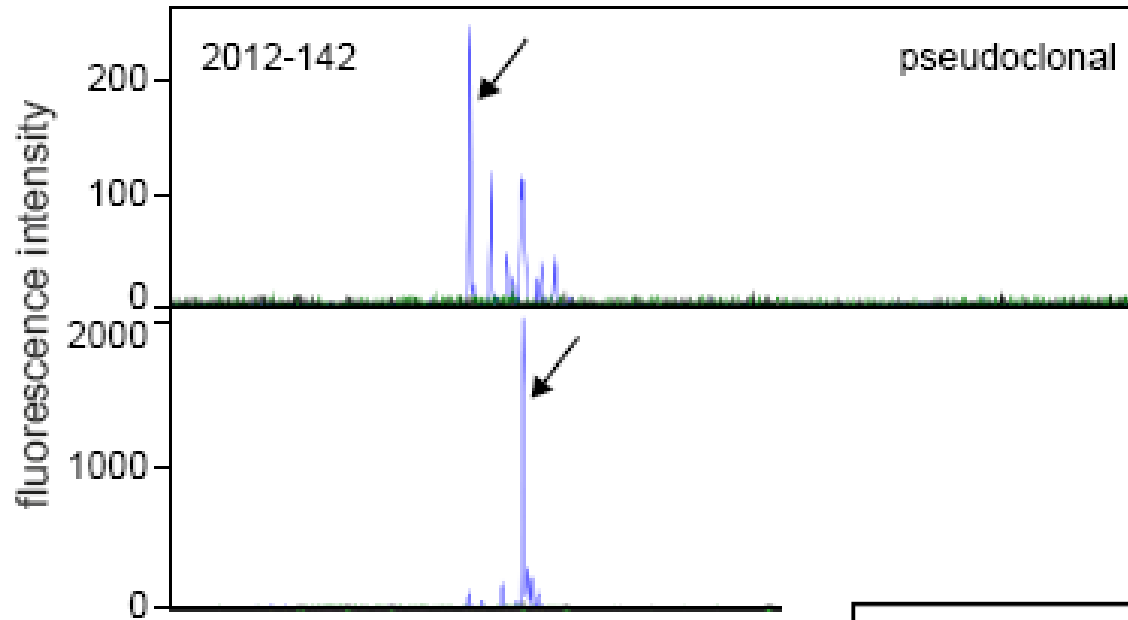
Primer binding op volgende JB segment > extra piek, zelfde herschikt gen, niet tellen als extra piek bij finale interpretatie!

Ook bij IGH en IGHK mogelijk!

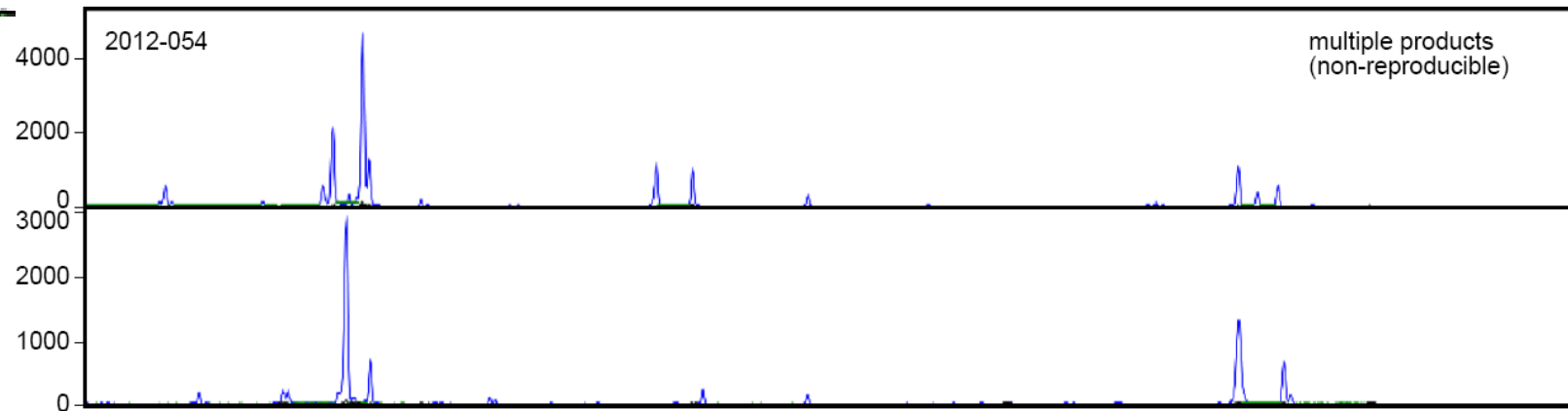


Interpretatie per tube: niet-reproduceerbaar

-
- 1 of 2 niet-reproduceerbaar (duidelijke) pieken / banden^b - pseudoklonaal
 - meerdere (n ≥ 3) niet-reproduceerbare pieken / banden^b - meerdere producten
-



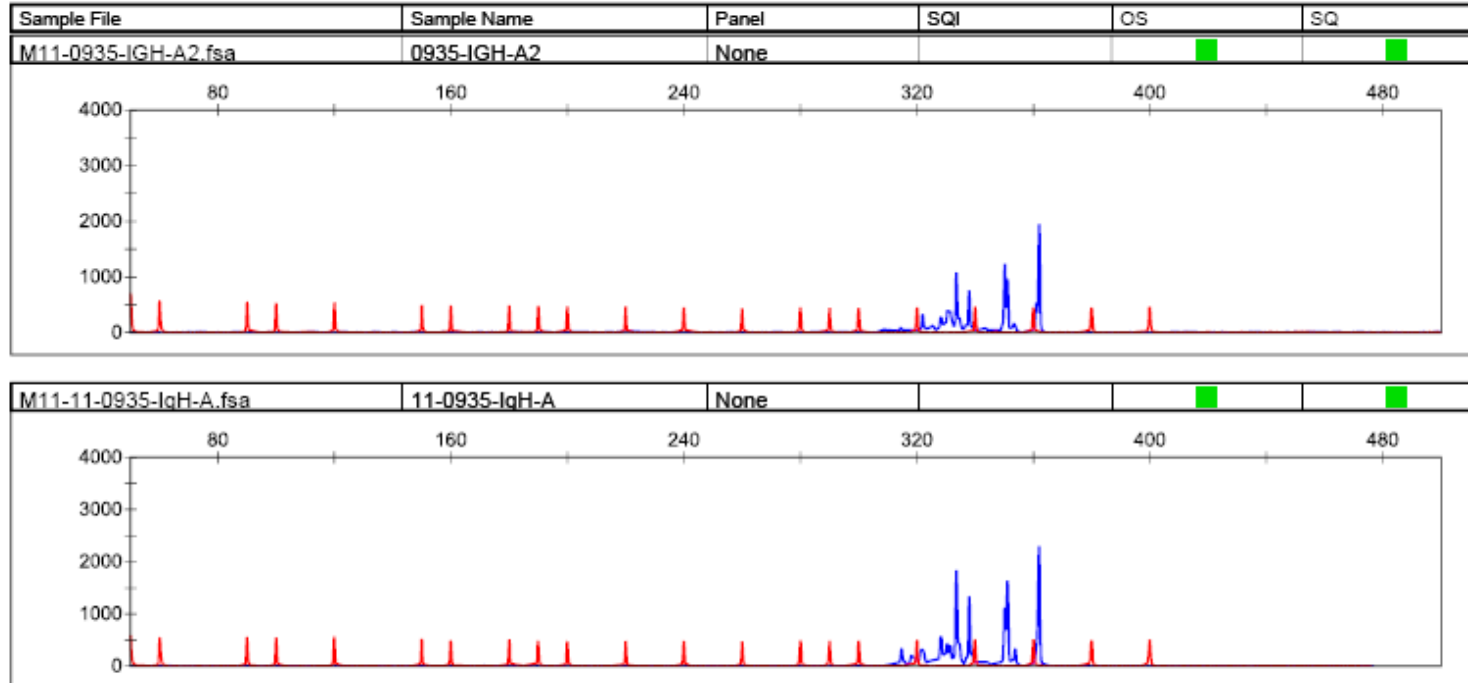
Duplo analyse heel belangrijk in FFPE materiaal of CSV
(degradatie DNA, weinig B- of T-cellen)



Interpretatie per tube: reproduceerbaar

- meerdere ($n \geq 3$) reproduceerbare pieken / banden^b

- meerdere producten ($n=...$) (...nt)

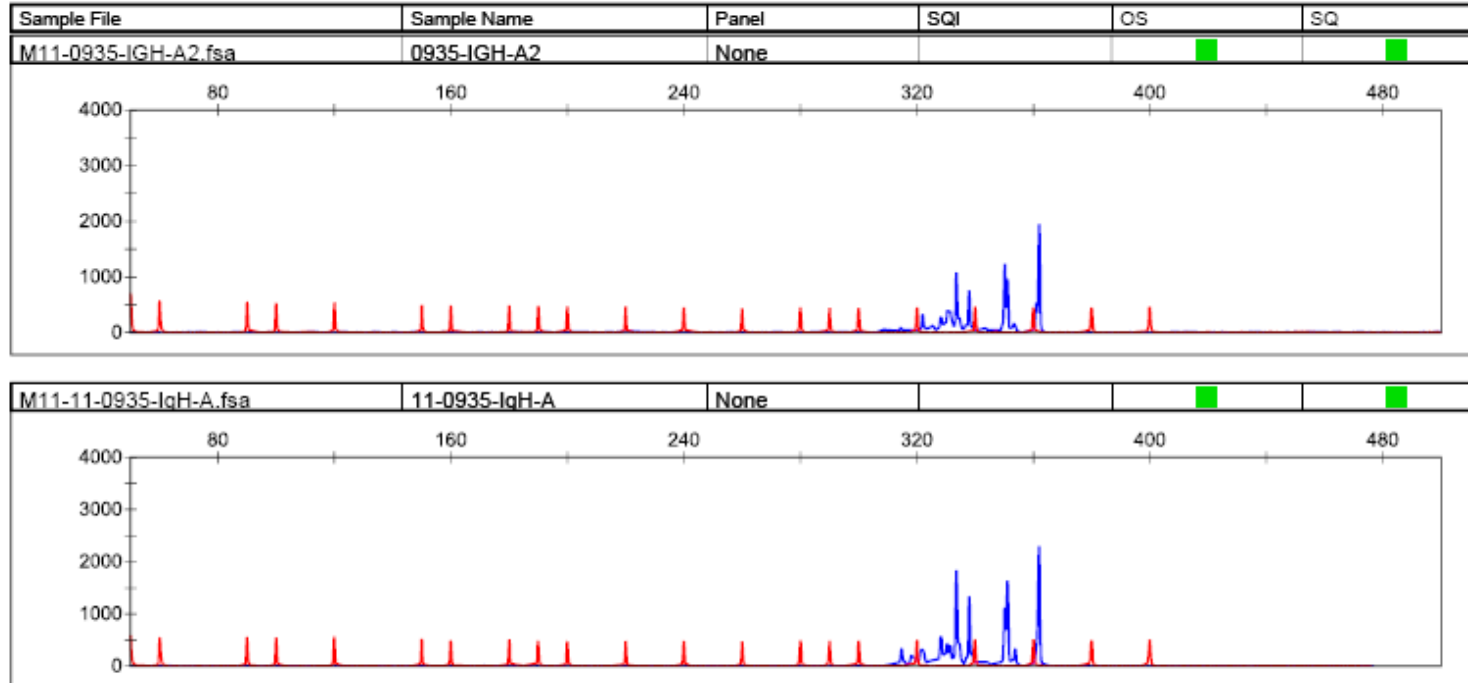


Immuunactivatie!

Interpretatie per tube: reproduceerbaar

- meerdere ($n \geq 3$) reproduceerbare pieken / banden^b

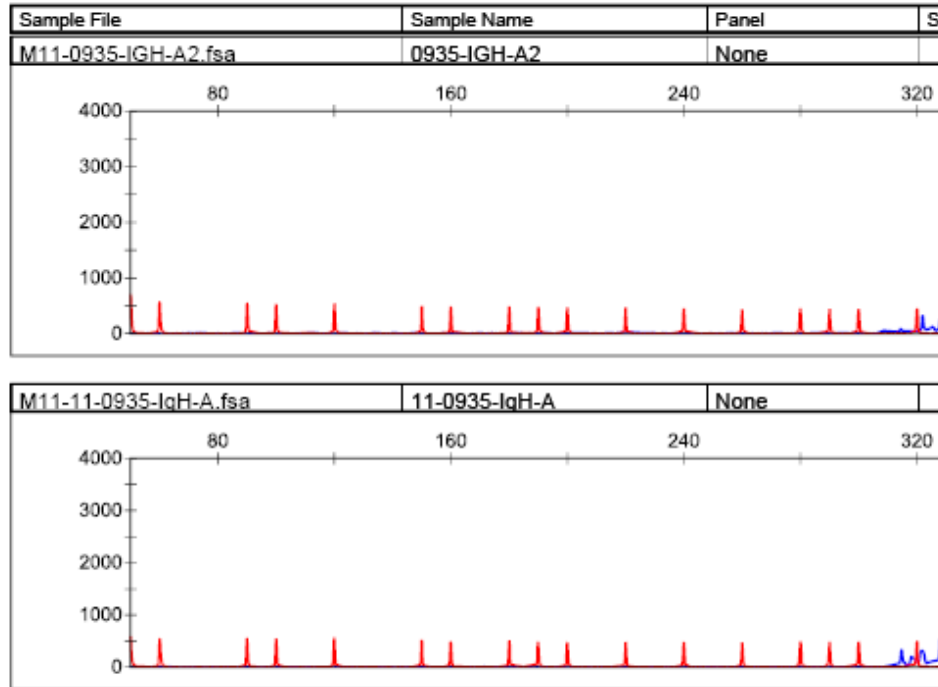
- meerdere producten ($n=...$) (...nt)



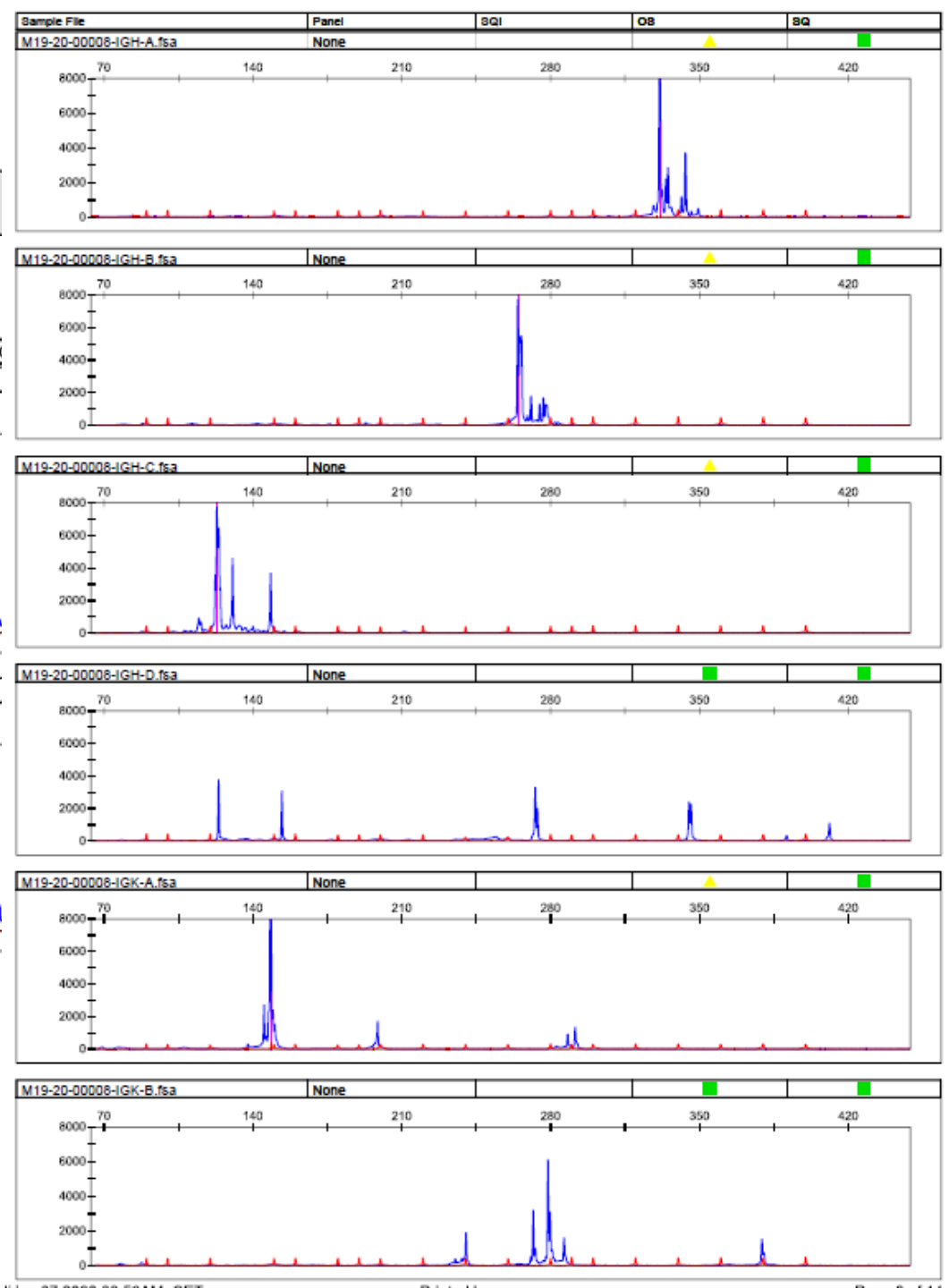
Immuunactivatie!

Interpretatie per tube: reproduceerbaar

- meerdere (n ≥ 3) reproduceerbare pieken / banden^b - meerdere producten (n=...) (...nt)



Immuunactivatie!



Interpretatie per tube

Tabel 4 EuroClonality uniform scoringssysteem m.b.t. technische beschrijving

<i>Type patron per tube (in duplo)</i>	<i>Technische beschrijving per tube</i>	<i>Optioneel: meer gedetailleerde technische beschrijving^a</i>
- geen pieken / banden (maar: slechte DNA kwaliteit)	- geen (<u>specifiek</u>) product, slecht DNA	
-geen pieken / banden (zonder achtergrond)	- geen (<u>specifiek</u>) product	- <u>niet-specifiek</u> product (... nt)
- 1 of 2 <u>reproduceerbare</u> klonale pieken / banden ^b	- klonaal (...nt)	- zwak klonaal (... nt) - klonaal (...nt) +polyklonale achtergrond (Gausse curve / smeer)
- 1 of 2 <u>niet-reproduceerbaar</u> (duidelijke) pieken / banden ^b	- pseudoklonaal	
- meerdere (n ≥3) <u>niet-reproduceerbare</u> pieken / banden ^b	- meerdere producten	
- meerdere (n ≥3) <u>reproduceerbare</u> pieken / banden ^b	- meerdere producten (n=...) (...nt)	
- Gausse curve / smeer ^c (met of zonder kleine reproduceerbare pieken / banden ^b)	- polyklonaal (niet klonaal ^c)	- onregelmatig polyklonaal (niet klonaal ^c)
- patroon dat niet past bij de bovenstaande beschrijvingen	- niet te beoordelen ^d	

Afkortingen: nt, nucleotide

^a Meer gedetailleerde technische beschrijving opties kunnen door de gebruiker worden aangevuld; enkele mogelijke voorbeelden zijn aangegeven

^b Bij HD analyse komt aantal banden en aantal PCR producten niet noodzakelijkerwijs overeen, omdat extra heteroduplexen tussen producten kunnen worden gevormd

^c Bij HD analyse kan een polyklonale smeer minder goed detecteerbaar zijn, ondanks specifiek product in de agarose gel; dit wordt gescoord als "niet klonaal"

^d In minder dan 5% van de PCR resultaten geen goede technische beschrijving mogelijk

Finale moleculaire interpretatie: waarom verschillende tubes per locus?

BIOMED-2 Concerted Action: BMH4-CT98-3936



IGH Framework- Clonality detection

in B-cell malignancies

	<i>IGH</i>			
	FR1	FR2	FR3	all FR
MCL (n=54)	100%	98%	93%	100%
B-CLL/SLL (n=56)	95%	91%	93%	100%
FL (n=109)	73%	76%	52%	84%
MZL (n=41)	73%	85%	68%	88%
DLBCL (n=109)	68%	61%	50%	79%
TOTAL (n=369)	79%	78%	66%	88%

Geen klonaliteit wegens:

1. *IGH*, *IGK*, *TRB*, *TRG* niet herschikt
2. Niet binden van 'consensus' primers
3. somatische hypermutatie

Finale moleculaire interpretatie: waarom verschillende loci?

BIOMED-2 Concerted Action: BMH4-CT98-3936



Complementarity of Ig targets for clonality detection in B-cell malignancies

	IGH			IGK			all IGH + IGK	DH-JH + Kde*
	VH-JH	DH-JH	VH-JH +DH-JH	Vκ-Jκ	Kde	Vκ-Jκ + Kde		
MCL (n=54)	100%	11%	100%	94%	75%	100%	100%	78%
B-CLL/SLL (n=56)	100%	43%	100%	96%	61%	100%	100%	73%
FL (n=109)	84%	19%	86%	63%	59%	84%	100%	64%
MZL (n=41)	88%	51%	95%	68%	54%	83%	100%	68%
DLBCL (n=109)	79%	30%	85%	61%	58%	80%	98%	72%
TOTAL (n=369)	88%	28%	91%	73%	60%	88%	99%	70%

Finale moleculaire interpretatie: waarom verschillende loci?

BIOMED-2 Concerted Action: BMH4-CT98-3936

UMC St Radboud

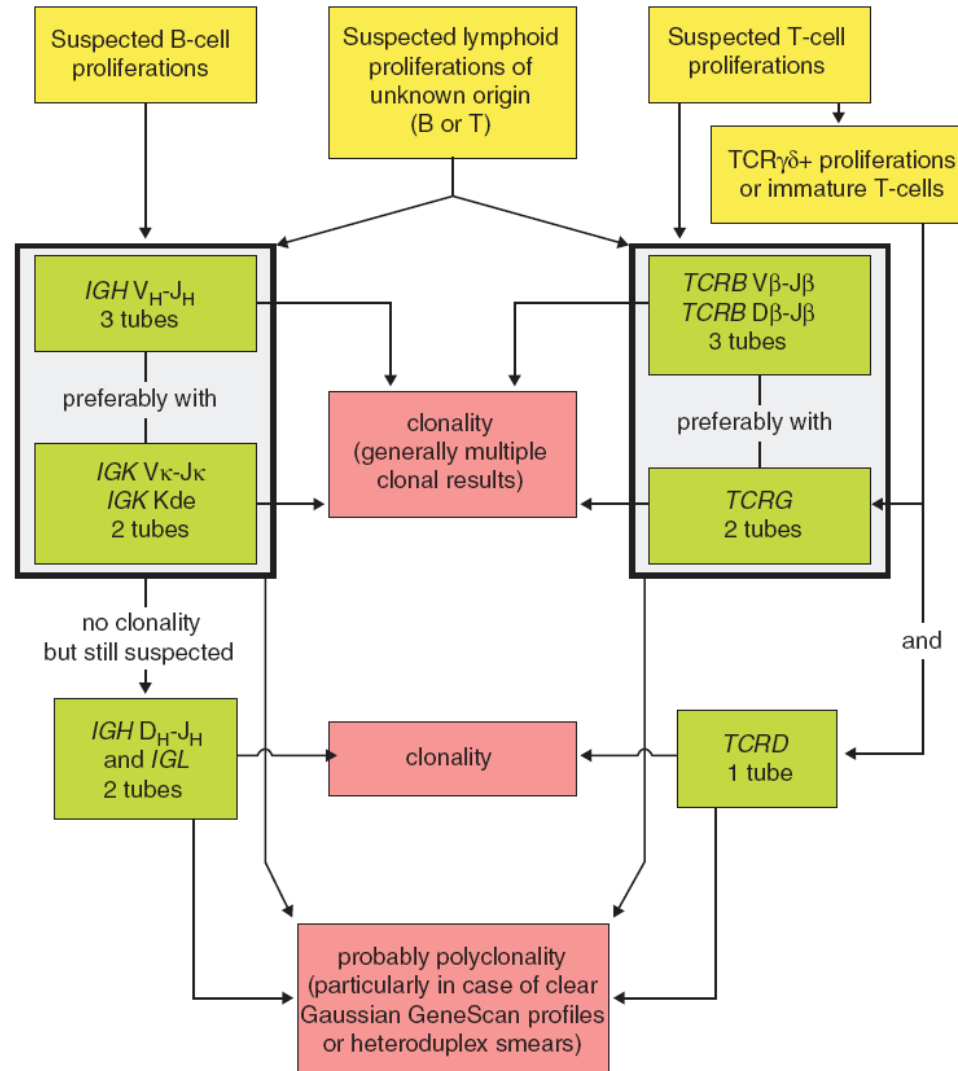
Complementarity of TCR targets for clonality detection in T-cell malignancies

	TCRB			TCRG <i>Vγ-Jγ</i>	TCRB + TCRG
	<i>Vβ-Jβ</i>	<i>Dβ-Jβ</i>	<i>Vβ-Jβ</i> + <i>Dβ-Jβ</i>		
T-PLL (n=33)	94%	47%	100%	94%	100%
T-LGL (n=28)	86%	62%	96%	96%	100%
PTCL-U (n=47)	85%	67%	98%	94%	100%
AITL (n=37)	70%	61%	89%	92%	95%
ALCL (n=43)	70%	48%	74%	74%	79%*
TOTAL (n=188)	80%	58%	91%	89%	94%* (99%)

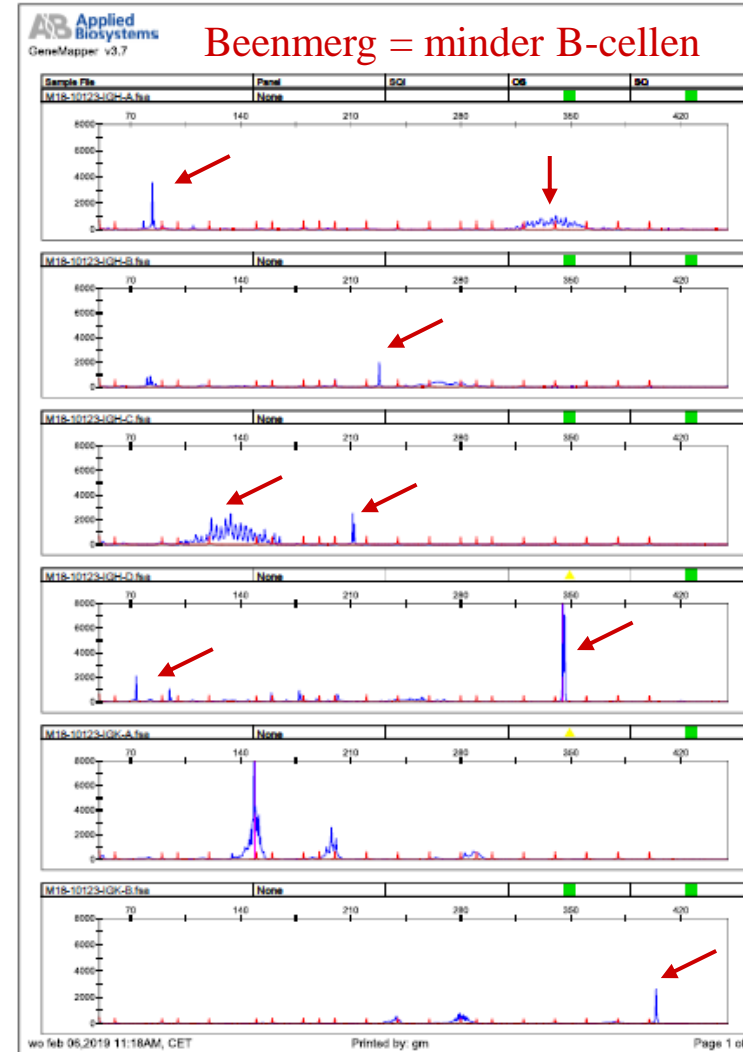
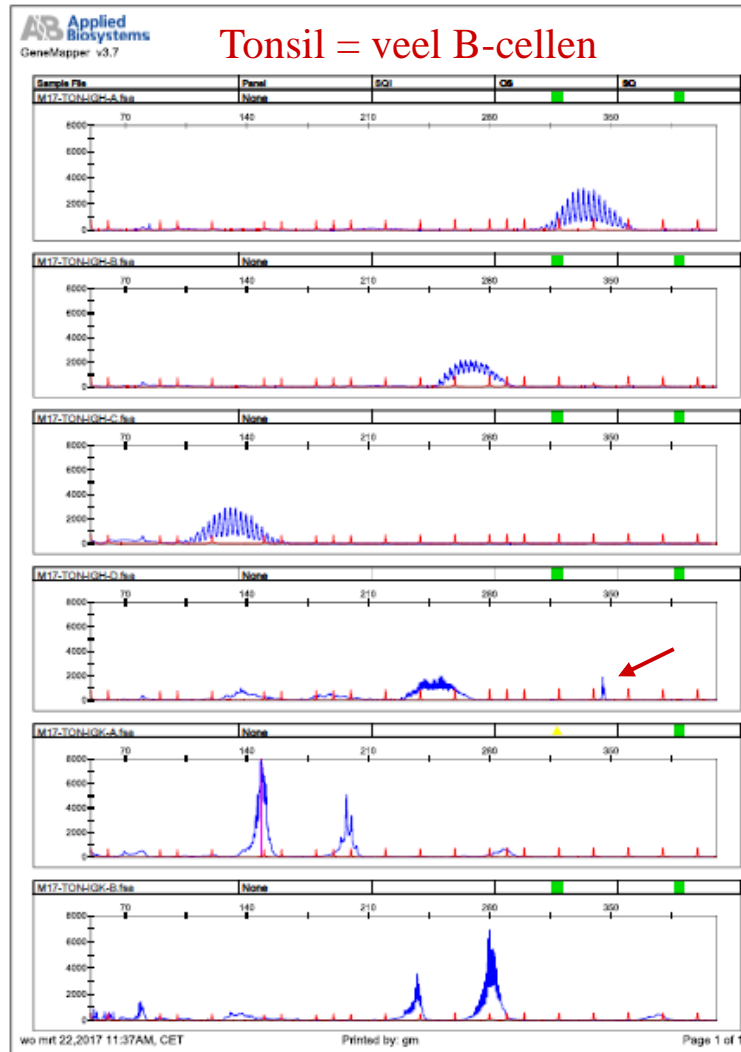
* 20% to 25 % of anaplastic large cell lymphomas do not have TCR gene rearrangements (null-ALCL)

M. Brüggemann et al, *Leukemia* 2007;21:215-221

Finale moleculaire interpretatie: waarom verschillende loci?



Finale moleculaire interpretatie: Moleculaire morfologie



Finale moleculaire interpretatie (alle tuben samen)

Tabel 5 EuroClonality uniform scoringsysteem m.b.t. moleculaire conclusie

<i>Overall technische beschrijving Ig/TCR</i>	<i>Moleculaire interpretatie / conclusie</i>	<i>Optioneel: meer gedetailleerde moleculaire interpretatie^a</i>
- geen (<u>specifiek</u>) product, slecht DNA	- niet te beoordelen, vanwege slechte DNA kwaliteit	
- geen (<u>specifiek</u>) product	- geen herschikkingen in Ig/ TCR targets detecteerbaar	
- klonaal (...nt) ^f	- klonaliteit detecteerbaar	- klonaliteit detecteerbaar (bialellische producten) - klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit) - klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product) - klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product) - klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster) - klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond
- pseudoklonaal / meerdere <u>niet-reproduceerbare</u> producten	- geen klonaliteit detecteerbaar, passend bij geringe hoeveelheid template	
- meerdere <u>reproduceerbare</u> producten (n≥3) ^b	- oligoklonaliteit / meerdere klonen detecteerbaar	- dominante kloon in oligo/polyklonale achtergrond
- polyklonaal (niet klonaal ^c)	- polyklonaliteit detecteerbaar (geen klonaliteit detecteerbaar ^c)	- polyklonaliteit detecteerbaar plus kleine kloon zonder duidelijke betekenis ^d
- niet te beoordelen	- niet te beoordelen ^e	

^a Meer gedetailleerde moleculaire interpretatie opties kunnen door de gebruiker worden aangevuld; enkele mogelijke voorbeelden zijn aangegeven

^b In geval van IGK en TCRB loci kunnen tot 4 producten detecteerbaar zijn binnen 1 kloon

^c Bij HD analyse kan een polyklonale smeer minder goed detecteerbaar zijn, ondanks specifiek product in de agarose gel; dit wordt gescoord als "niet klonaal"

^d Voor gevallen met kleine reproduceerbare pieken / banden in een polyklonale achtergrond

^e In minder dan 5% van de gevallen geen goede moleculaire interpretatie mogelijk

^f Klonale pieken / banden hoeven niet noodzakelijkerwijs in elk Ig/TCR target aanwezig te zijn om tot de moleculaire conclusie "klonaliteit gedetecteerd"

Finale moleculaire interpretatie (alle tuben samen)

Tabel 5 EuroClonality uniform scoringsysteem m.b.t. moleculaire conclusie

Overall technische beschrijving Ig/TCR	Moleculaire interpretatie / conclusie	Optioneel: meer gedetailleerde moleculaire interpretatie ^a
- geen (<u>specifiek</u>) product, slecht DNA	- niet te beoordelen, vanwege slechte DNA kwaliteit	
- geen (<u>specifiek</u>) product	- geen herschikkingen in Ig/ TCR targets detecteerbaar	
- klonaal (...nt) ^f	- klonaliteit detecteerbaar	- klonaliteit detecteerbaar (biallysische producten) - klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit) - klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product) - klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product) - klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster) - klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond
- pseudoklonaal / meerdere <u>niet-reproduceerbare</u> producten	- geen klonaliteit detecteerbaar, passend bij geringe hoeveelheid template	
- meerdere <u>reproduceerbare</u> producten (n≥3) ^b	- oligoklonaliteit / meerdere klonen detecteerbaar	- dominante kloon in oligo/polyklonale achtergrond
- polyklonaal (niet klonaal ^c)	- polyklonaliteit detecteerbaar (geen klonaliteit detecteerbaar ^c)	- polyklonaliteit detecteerbaar plus kleine kloon zonder duidelijke betekenis ^d
- niet te beoordelen	- niet te beoordelen ^e	

^a Meer gedetailleerde moleculaire interpretatie opties kunnen door de gebruiker worden aangevuld; enkele mogelijke voorbeelden zijn aangegeven

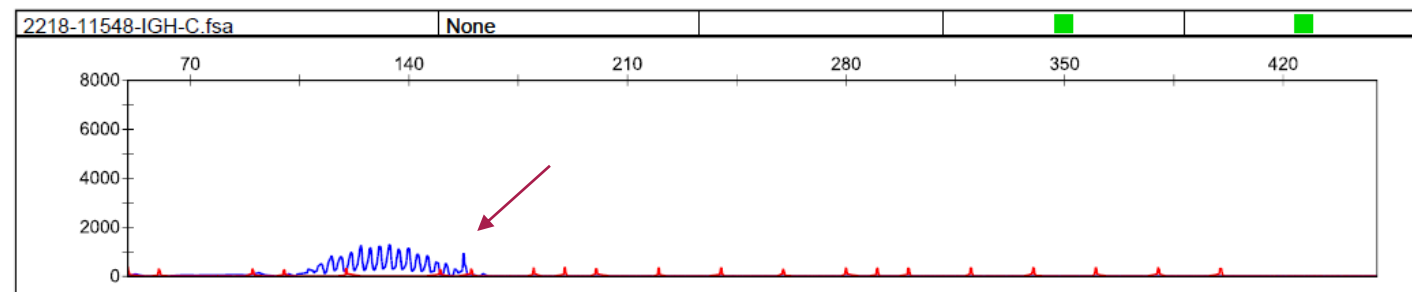
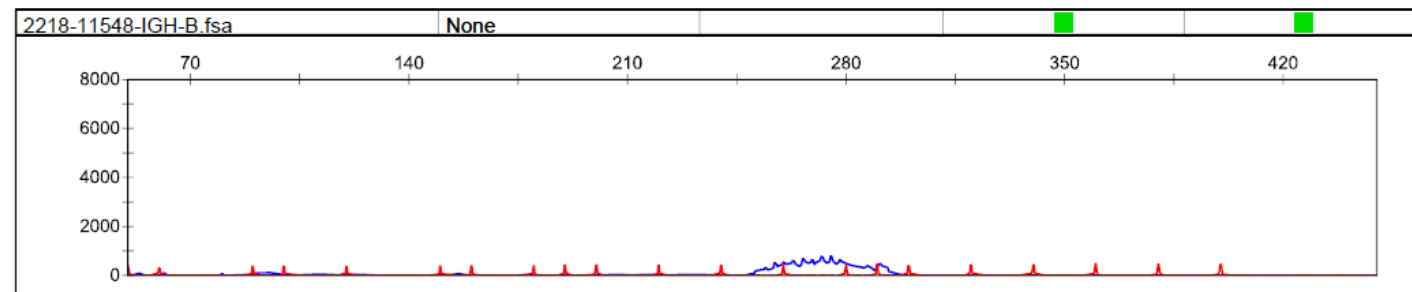
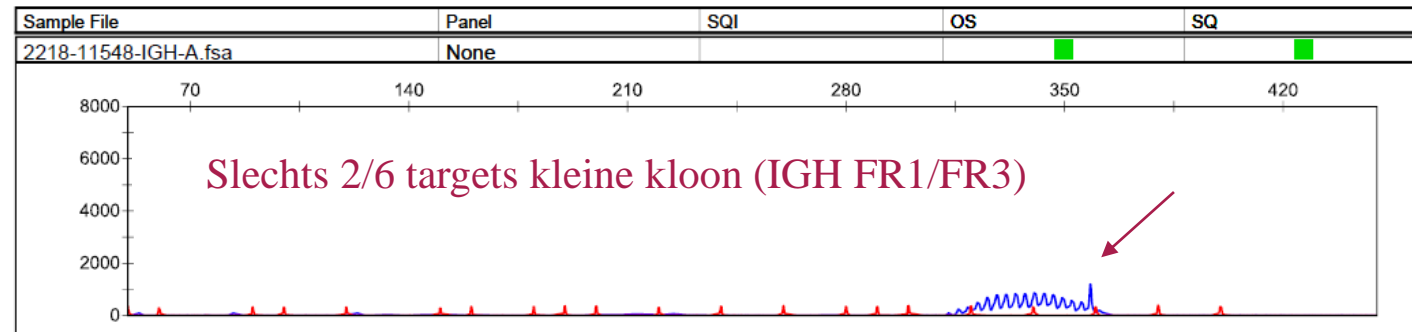
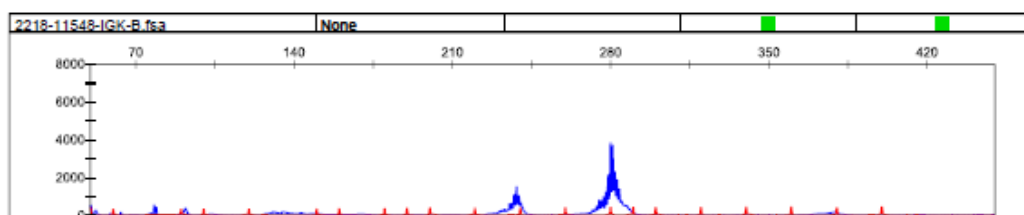
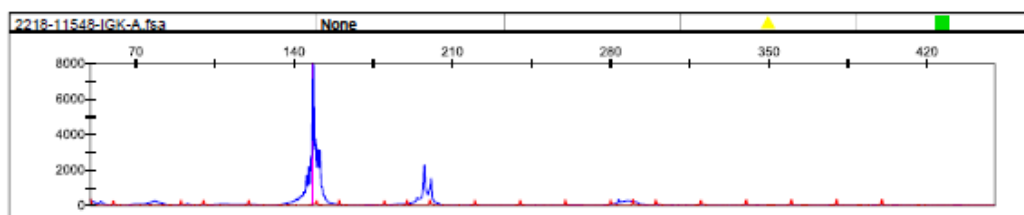
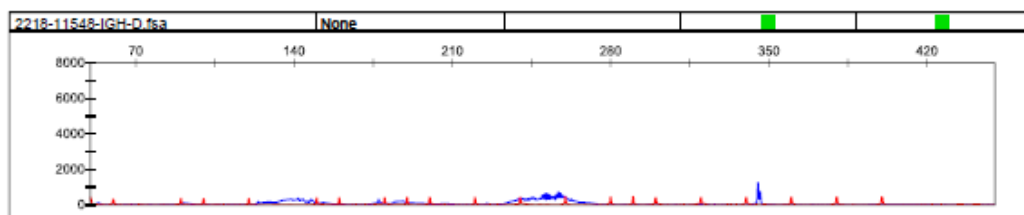
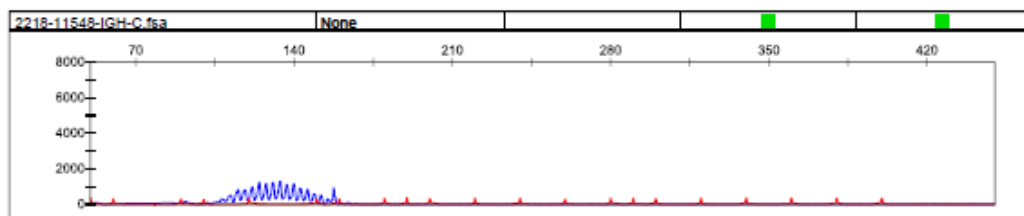
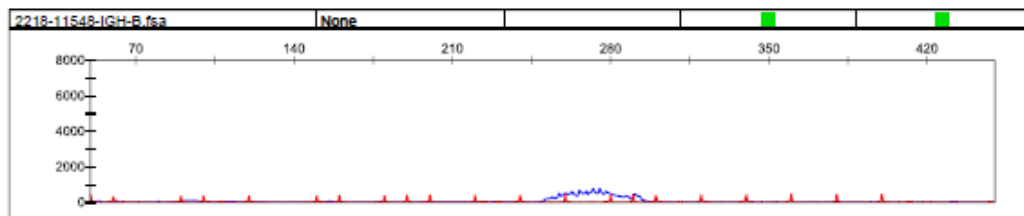
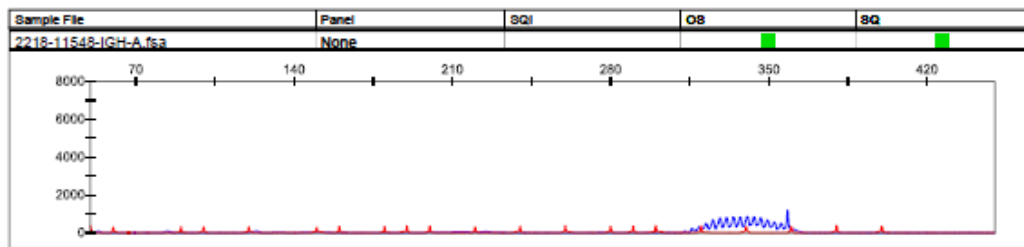
^b In geval van IGK en TCRB loci kunnen tot 4 producten detecteerbaar zijn binnen 1 kloon

^c Bij HD analyse kan een polyklonale smeer minder goed detecteerbaar zijn, ondanks specifiek product in de agarose gel; dit wordt gescoord als "niet klonaal"

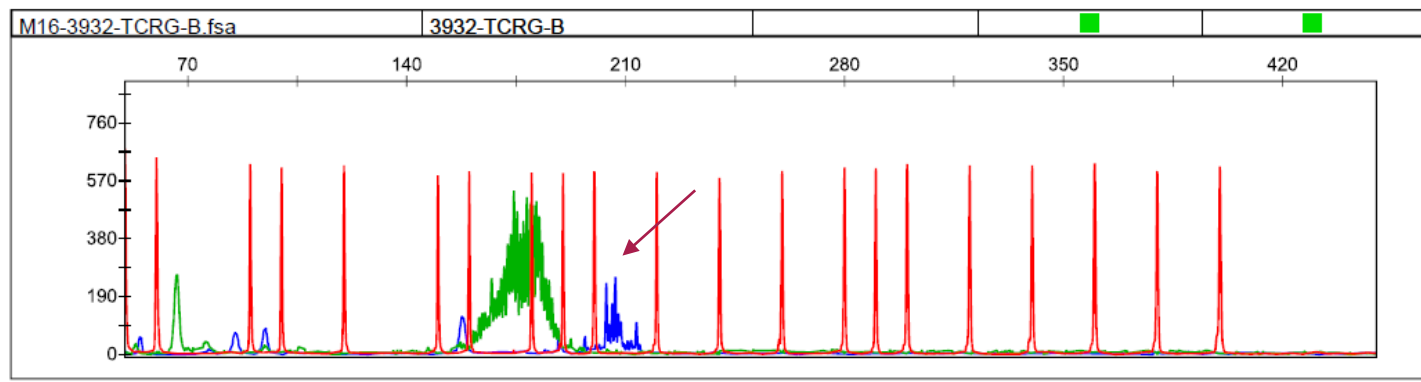
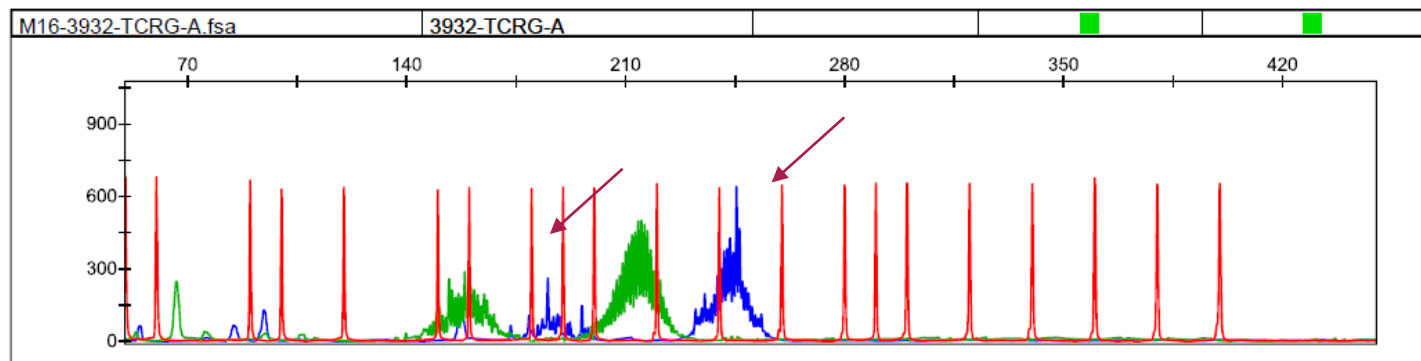
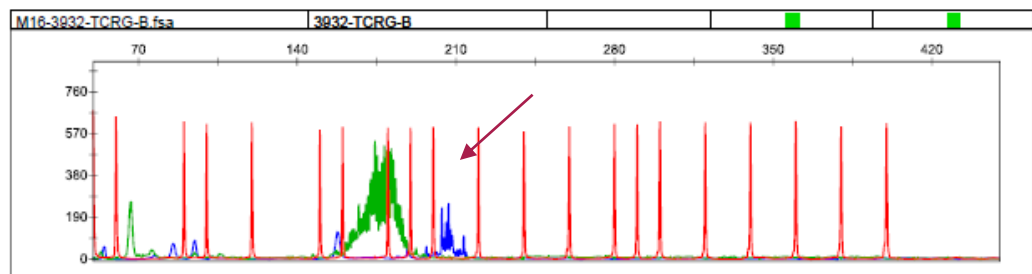
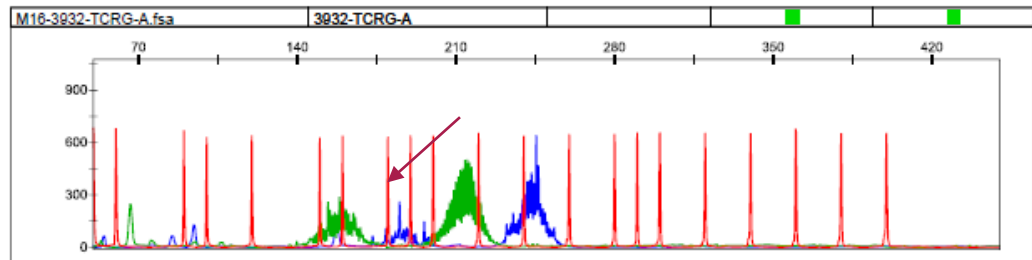
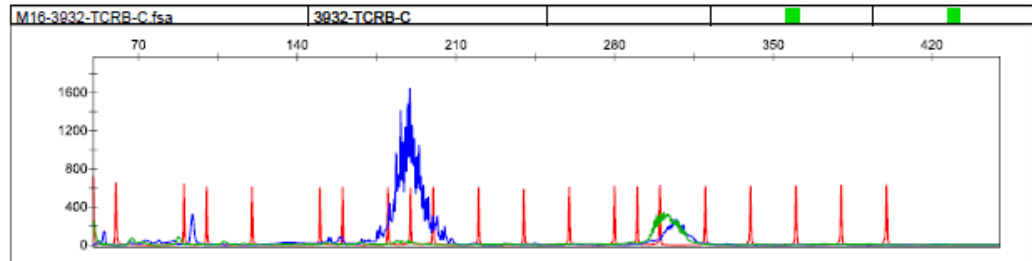
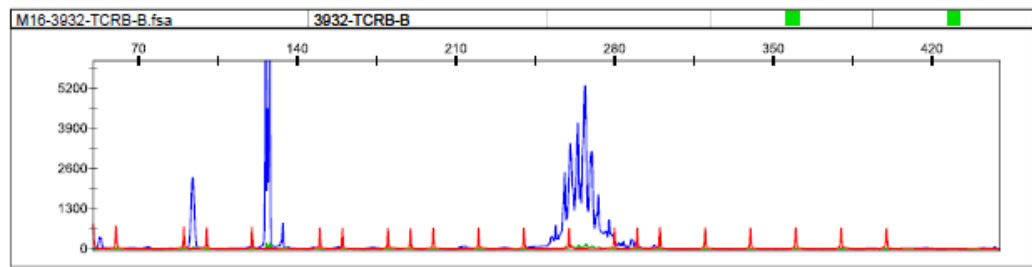
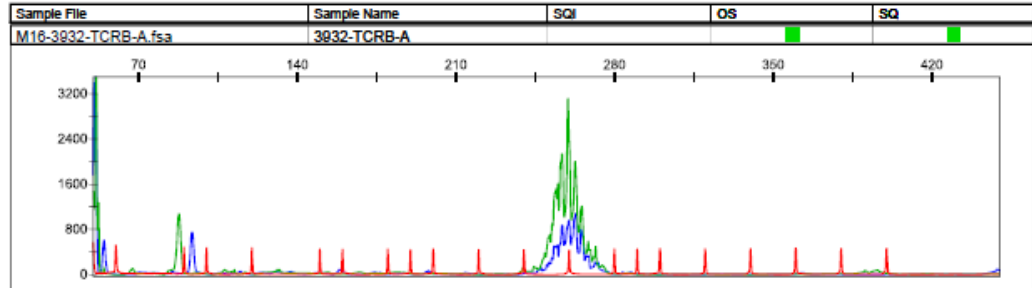
^d Voor gevallen met kleine reproduceerbare pieken / banden in een polyklonale achtergrond

^e In minder dan 5% van de gevallen geen goede moleculaire interpretatie mogelijk

^f Klonale pieken / banden hoeven niet noodzakelijkerwijs in elk Ig/TCR target aanwezig te zijn om tot de moleculaire conclusie "klonaliteit gedetecteerd"

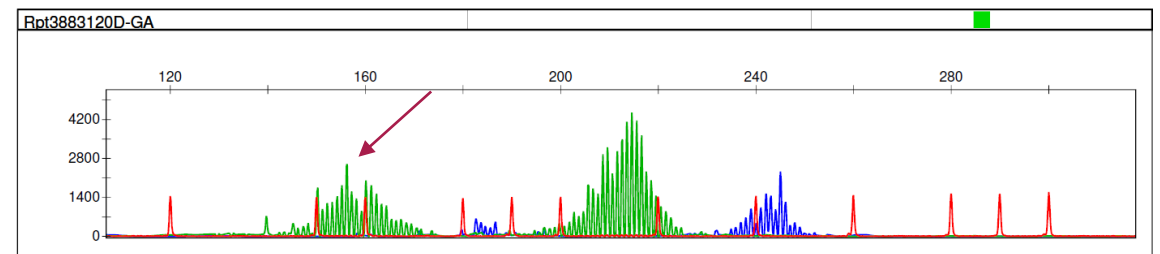
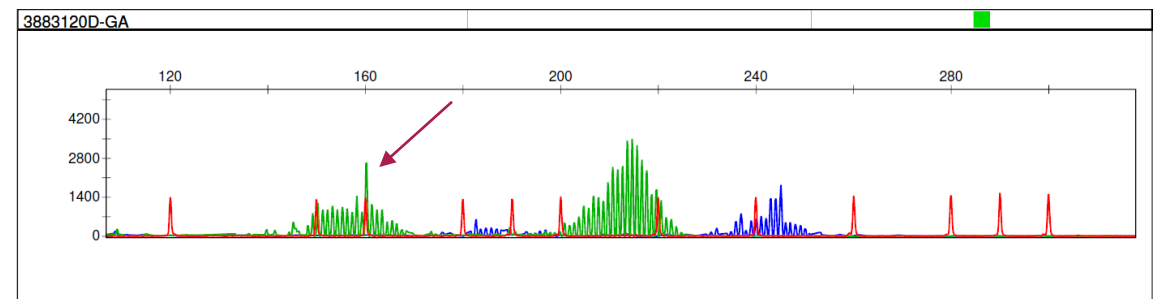
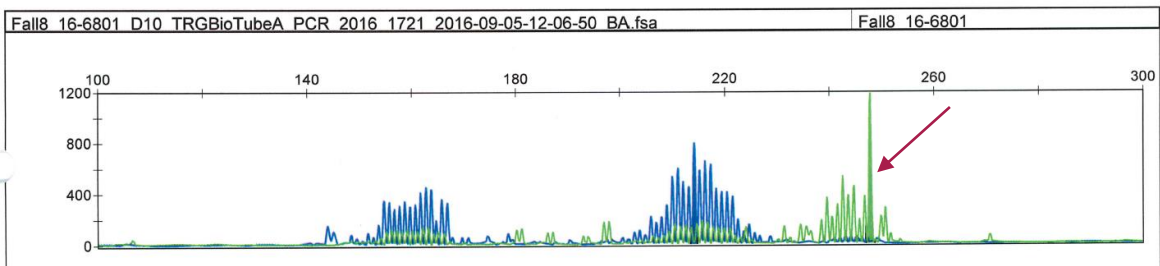
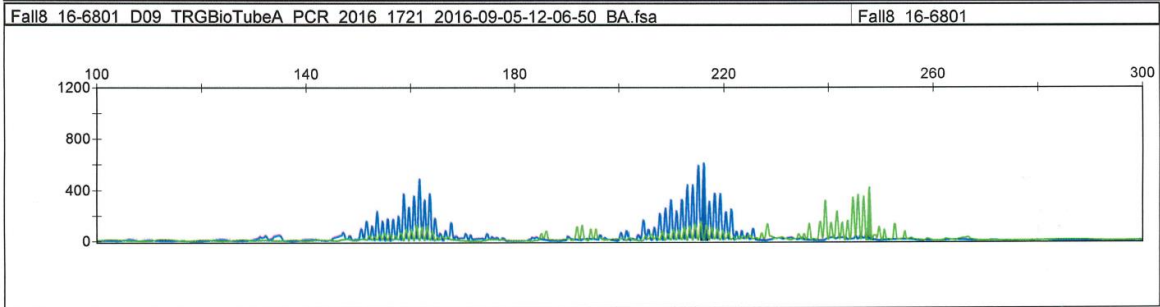


Polykloonaal plus kleine kloon zonder duidelijke betekenis
 OF
 Klonaaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up
 analyse / nieuw monster)

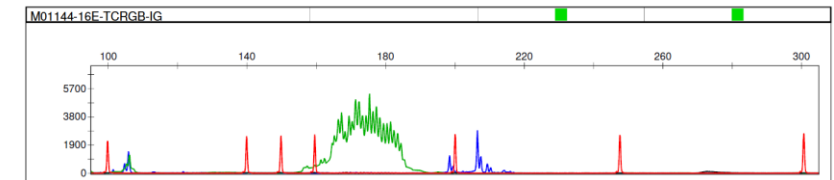
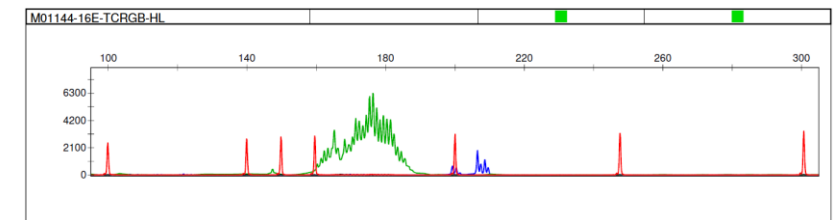
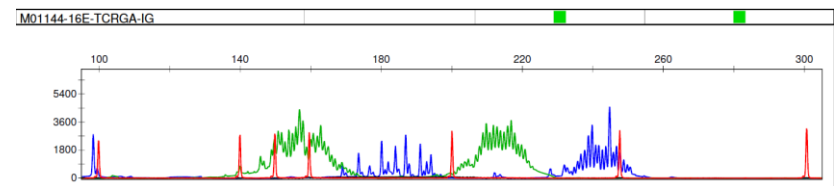
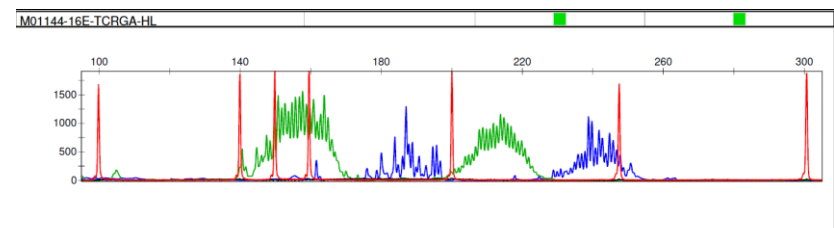


Polyklonaal plus kleine kloon(s) zonder duidelijke betekenis
 OF
 Klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up
 analyse / nieuw monster)

Bij TCR patronen vaker 'kleine kloon(s)' en patroon LAB-afhankelijk



Kleine kloon(s) niet altijd reproduceerbaar
Duplo analyses helpen!

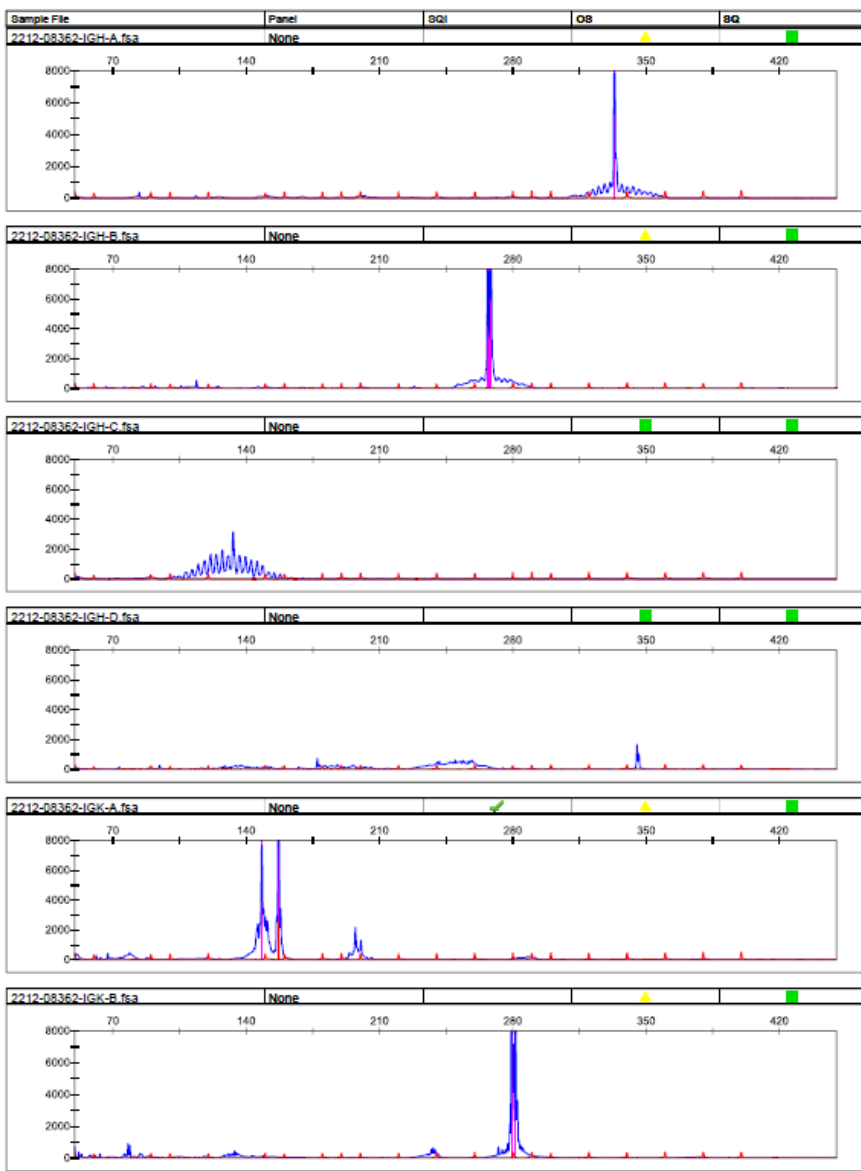


Finale moleculaire interpretatie: klonaal + polyklonaal

- klonaal (...nt)

- klonaliteit detecteerbaar

- klonaliteit detecteerbaar (biallelische producten)
- klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit)
- klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster)
- klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond



IGH Locus > 1 x VDJ (+ somatische hypermutatie)
IGH Locus > in alle targets nog polyklonaal

Klonaal + polyklonaal

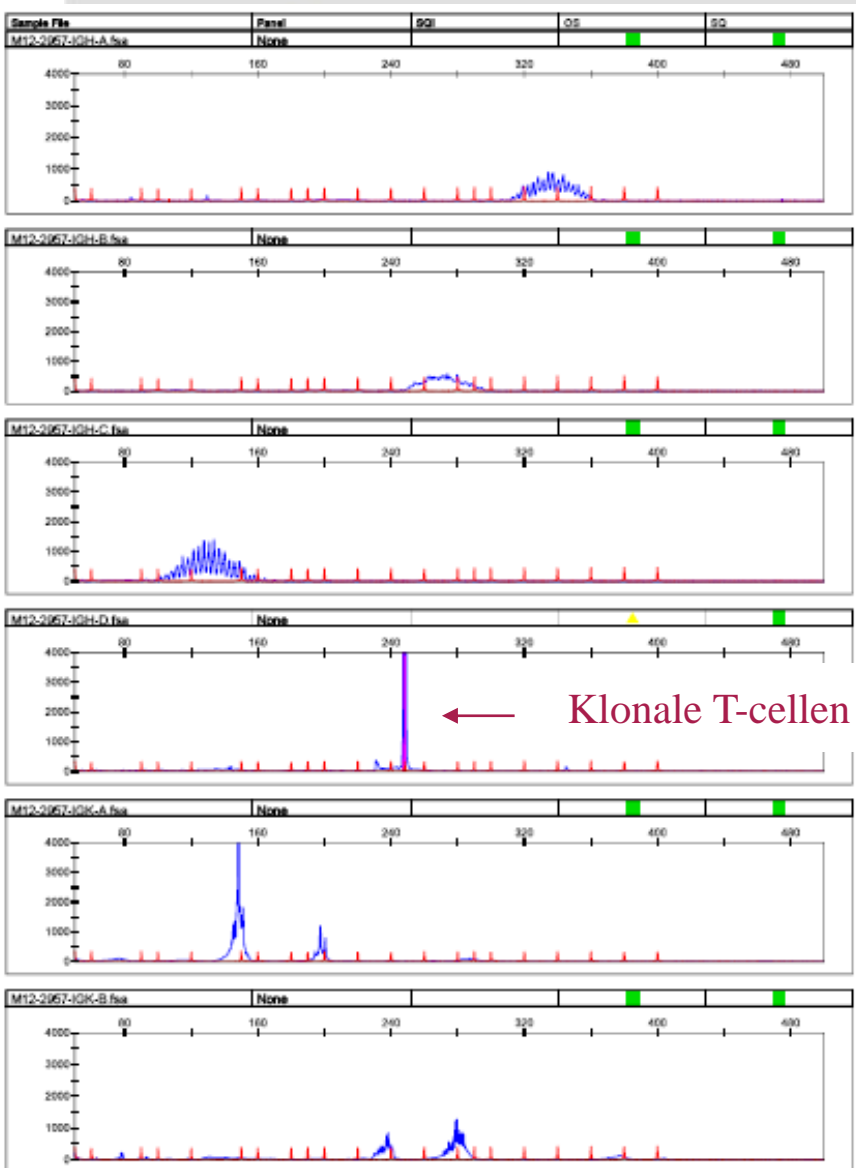
IGK Locus > 1 x Vk1,6,7-JK en 1 x Vk3-KDE of Intr-KDE
IGK Locus > in alle targets nog polyklonaal (soms heel zwak, tube IGK-B)

Finale moleculaire interpretatie: geïsoleerd klonaal product

- klonaal (...nt)

- klonaliteit detecteerbaar

- klonaliteit detecteerbaar (biallelische producten)
- klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit)
- klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster)
- klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond



IGH Locus > 1 x DJ
 IGH Locus > andere tubes polyklonaal

Geïsoleerd klonaal product

Kan indicatie zijn van
CROSS-LINEAGE
 herschikking

IGK Locus > polyklonaal

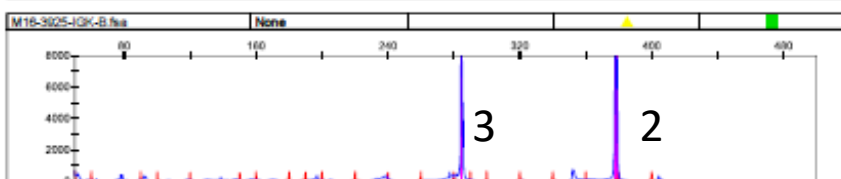
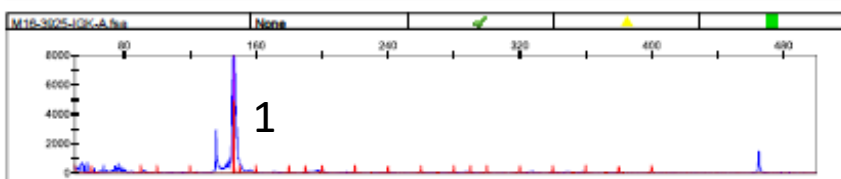
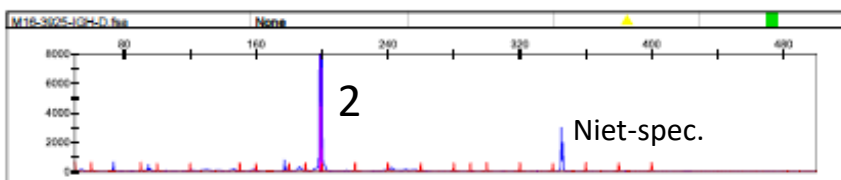
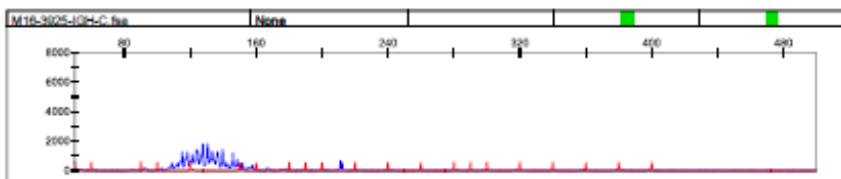
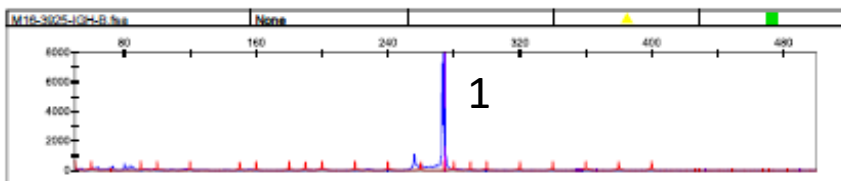
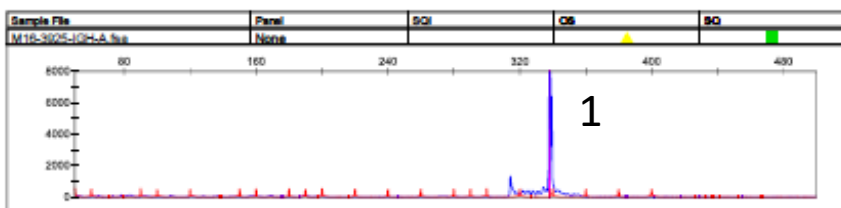
Vaak partieel herschikte genen
 > DJ bij IGH en TRB

Finale moleculaire interpretatie: biallelisch versus biklonaal

- klonaal (...nt)

- klonaliteit detecteerbaar

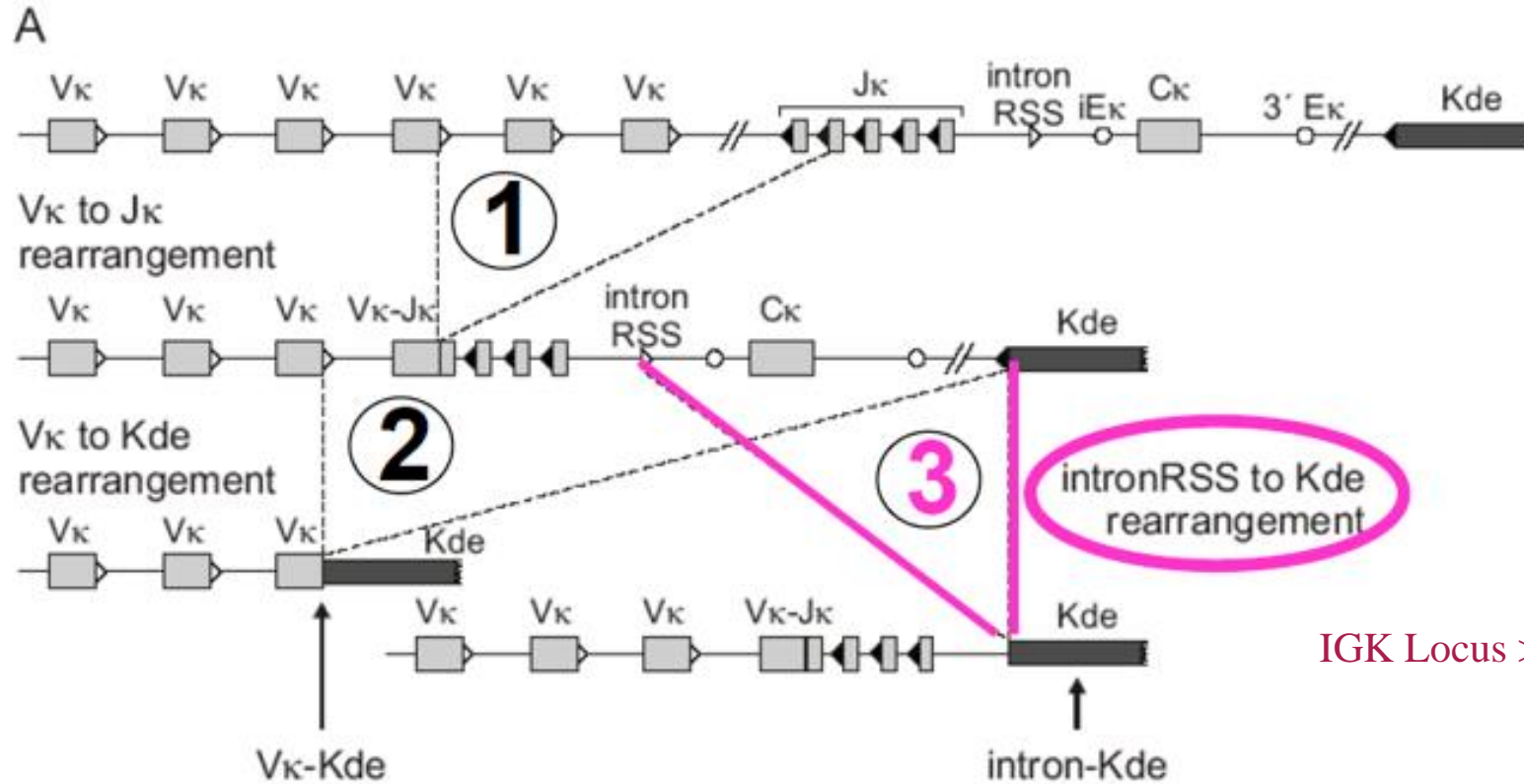
- klonaliteit detecteerbaar (biallelische producten)
- klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit)
- klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster)
- klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond



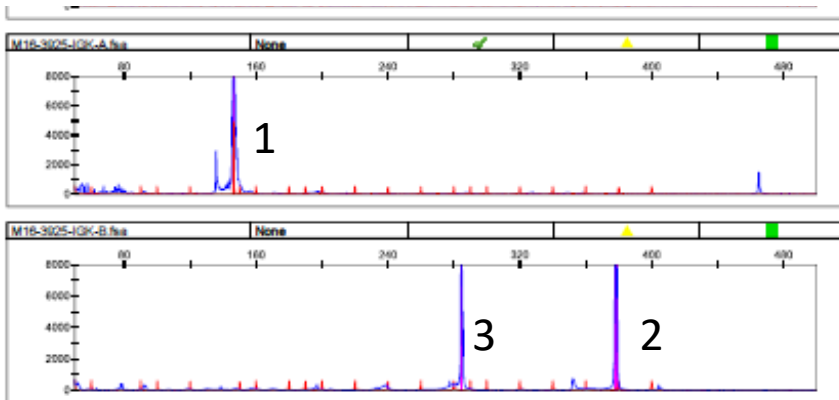
IGH Locus > 1 x VDJ (+ som. Hypermutatie) en 1x DJ
 IGH Locus > biallelisch = 2 herschikte chromosomen

IGK Locus > 3 klonale pieken > 2 klonen? > NEE!

Finale moleculaire interpretatie: biallelisch versus biklonaal

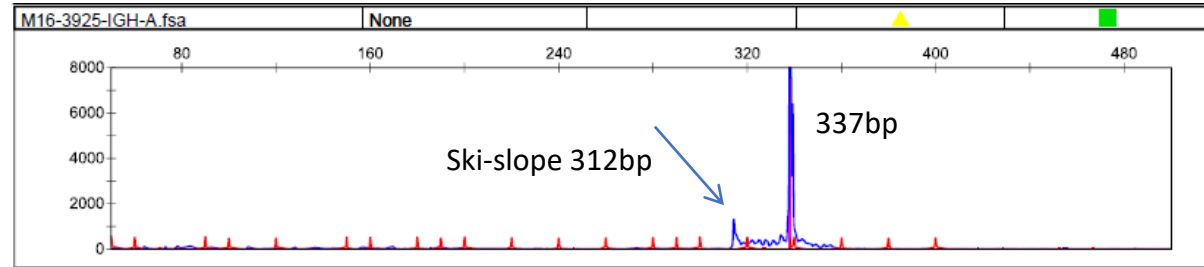
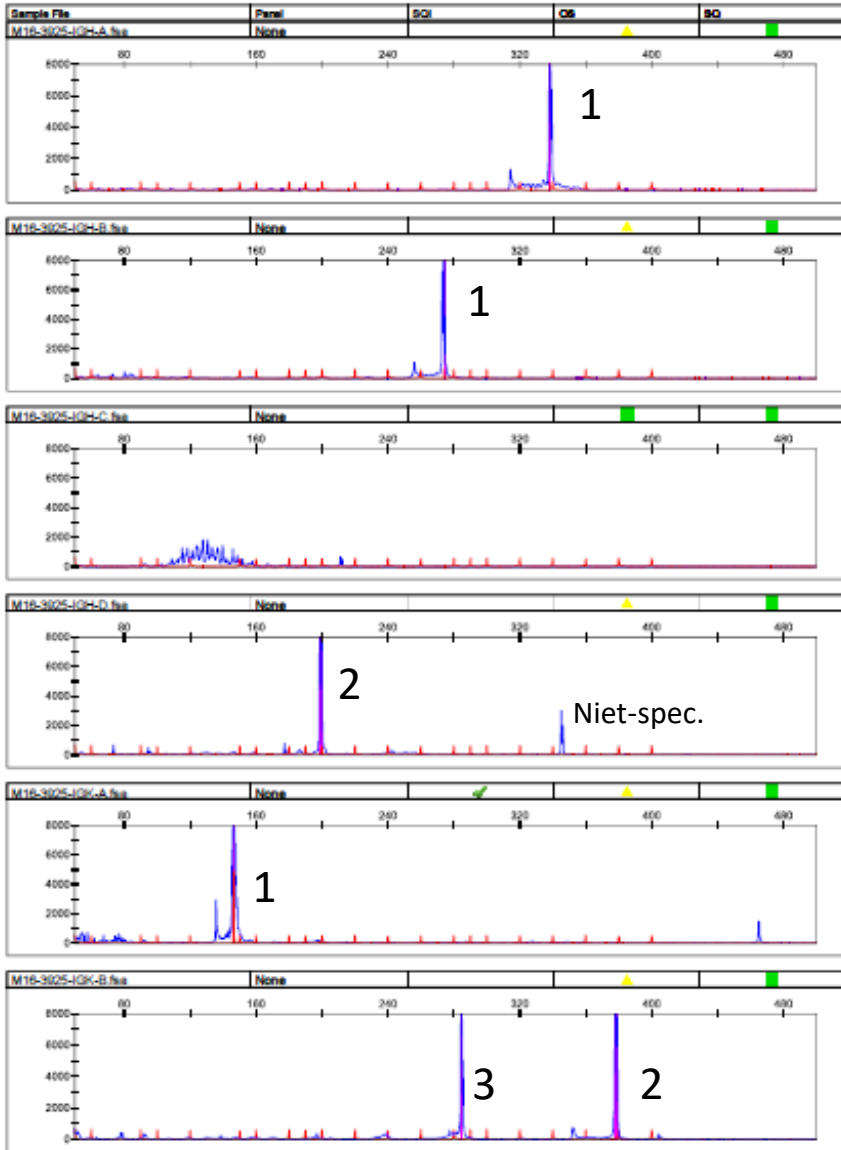


IGK Locus > 4 klonale pieken kan = 1 kloon



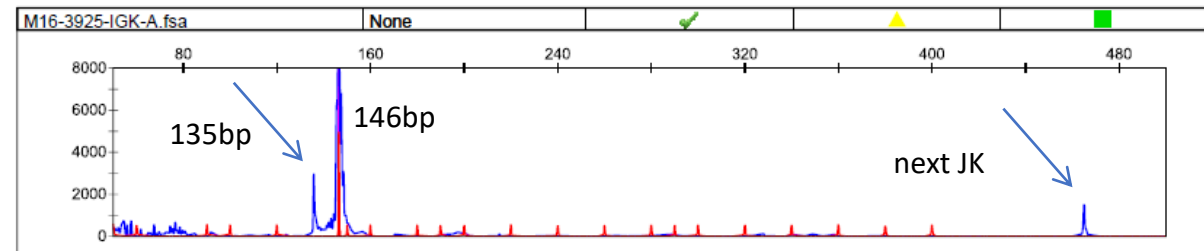
IGK Locus > 3 klonale pieken > 2 klonen? > NEE!
IGK Locus > biallelisch = 2 herschikte chromosomen

Finale moleculaire interpretatie: biallelisch versus biklonaal



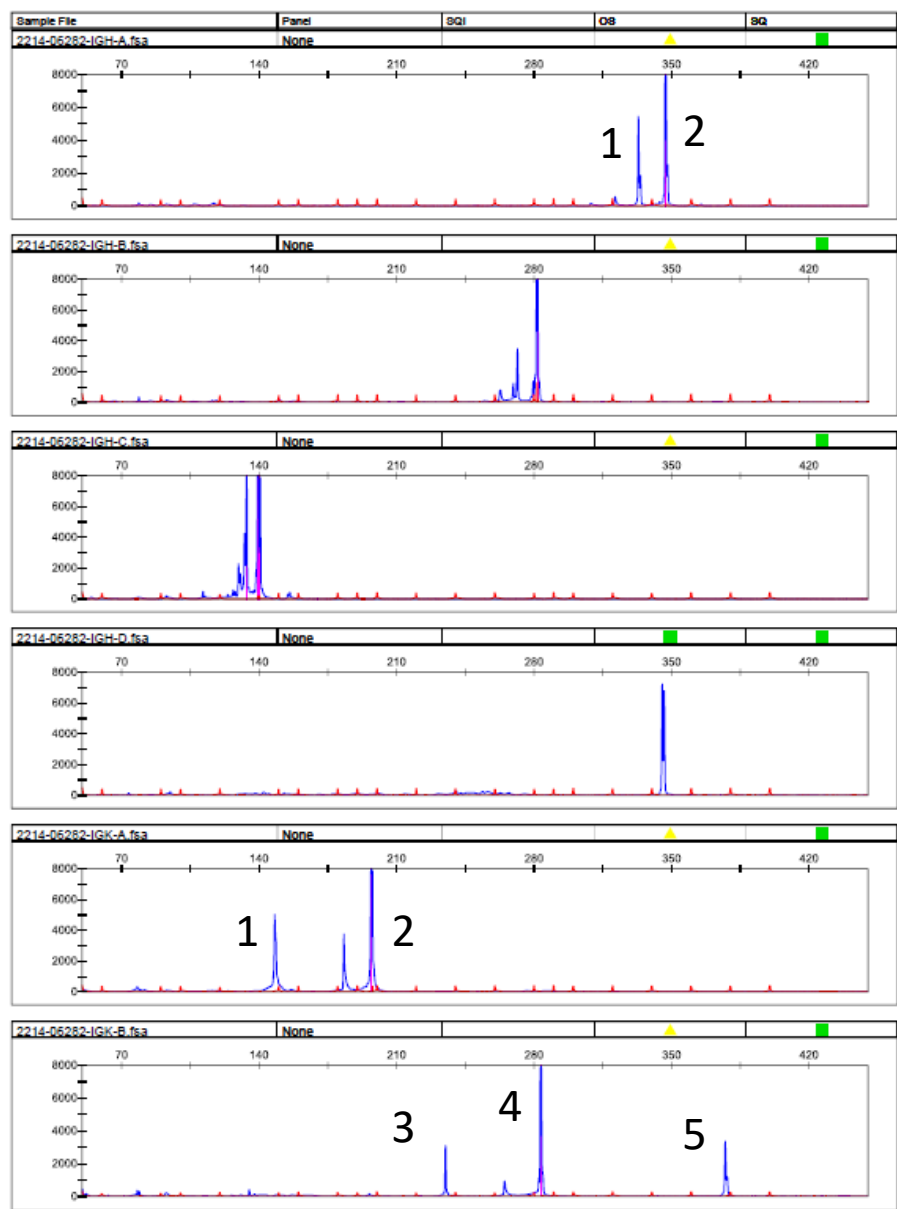
2 x VDJ + 1DJ

Biklonaal als je ski-slope (overload) of 'next JK' pieken meetelt > geen correcte interpretatie!



2 x VJ + intr/Vk3-KDE + Vk-KDE

Finale moleculaire interpretatie: biallelisch versus biklonaal



IGH Locus > 2 x VDJ
IGH Locus > biallelisch

Biklonaal (ook op flow!)

Suggestief voor 2 klonale populaties

Indicatief voor 'dubbele pathologie' of
2 klonen binnen dezelfde pathologie

Voorbeeld: MBL + DLBCL

IGK Locus > 5 pieken > biclonaal

Allel 1 = 2 + 4

Allel 2 = 1

Allel 3 = 3

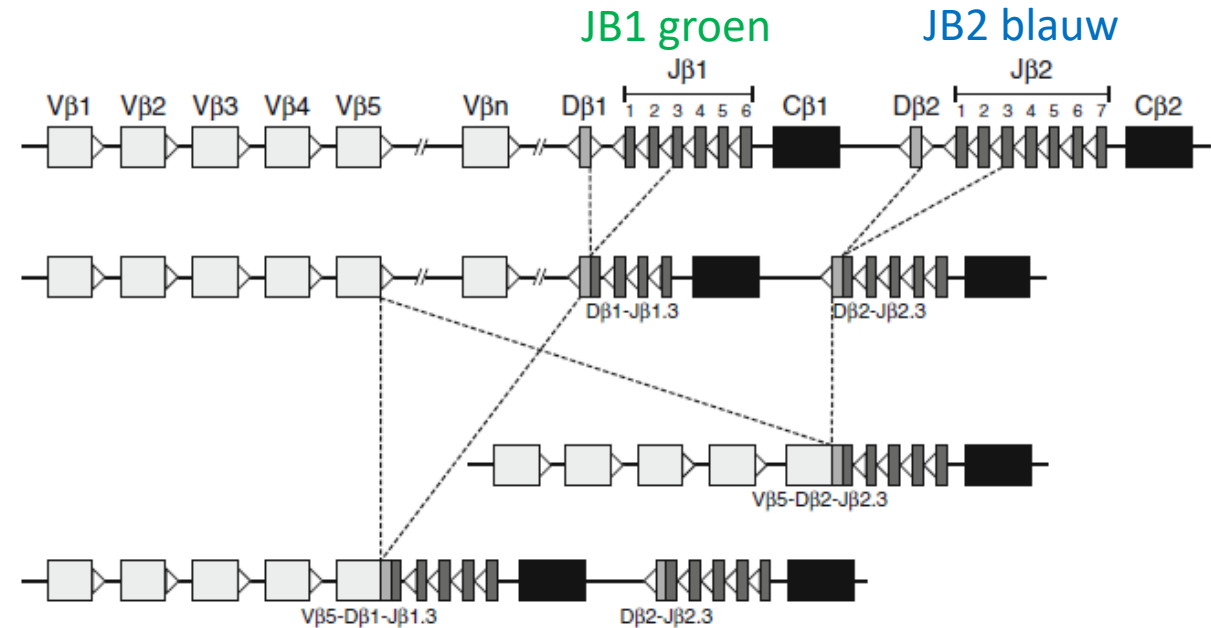
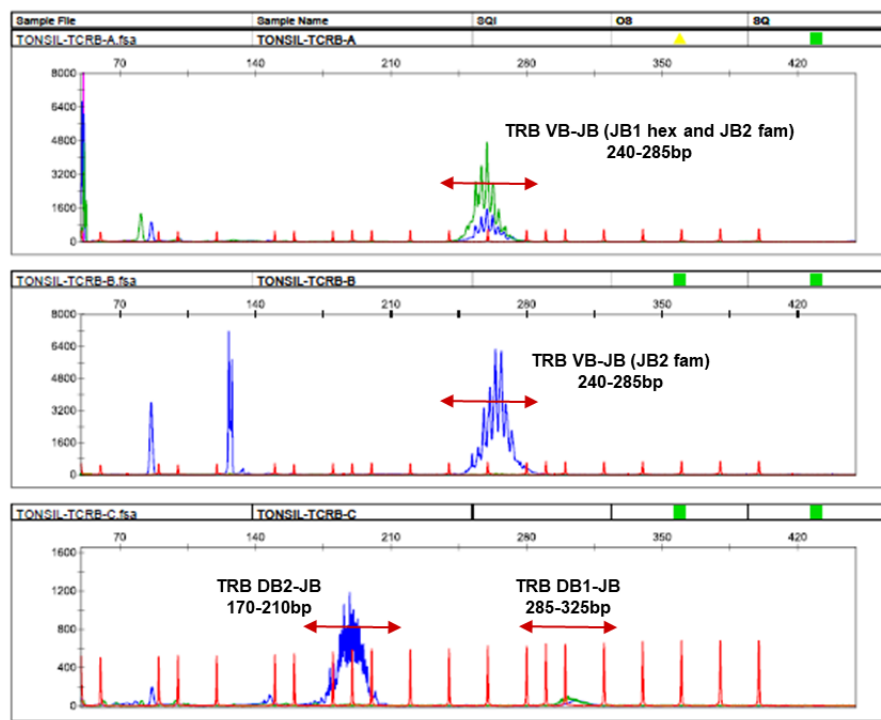
Allel 4 = 5

Finale moleculaire interpretatie: biallelisch versus biklonaal

- klonaal (...nt)

- klonaliteit detecteerbaar

- klonaliteit detecteerbaar (biallelische producten)
- klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit)
- klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster)
- klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond



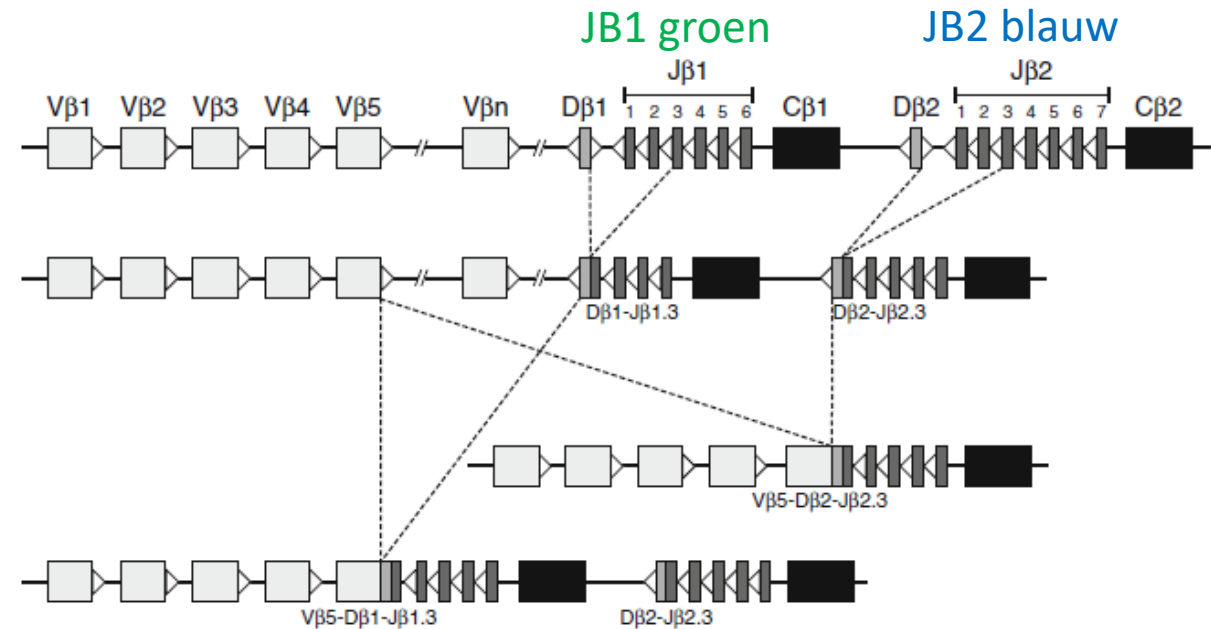
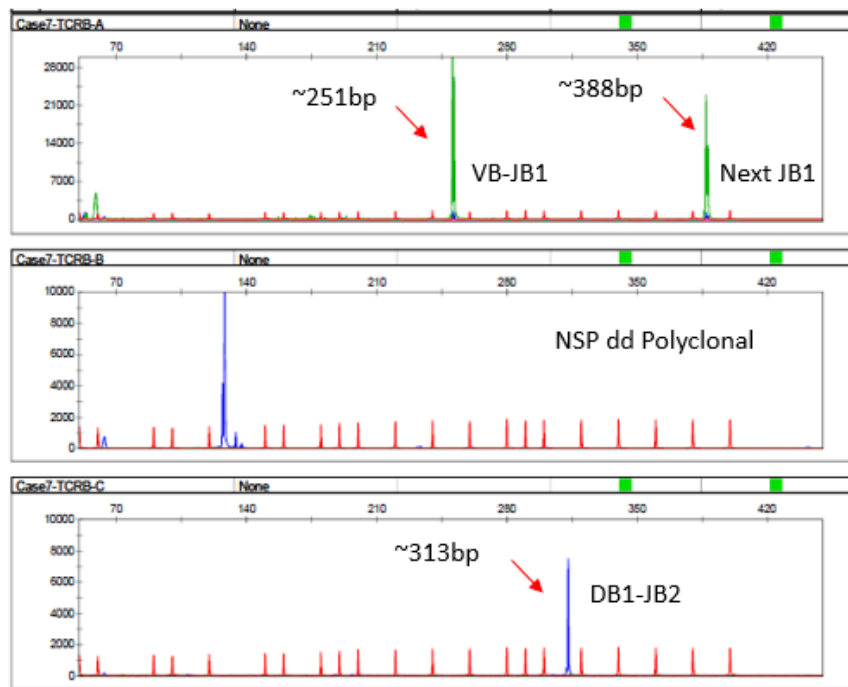
TRB Locus > 4 klonale pieken kan = 1 kloon

Finale moleculaire interpretatie: biallelisch versus biklonaal

- klonaal (...nt)

- klonaliteit detecteerbaar

- klonaliteit detecteerbaar (biallelische producten)
- klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit)
- klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster)
- klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond



TRB locus: clonal, biallelic

Allele 1 = TRBV4-TRBJ1.1 (HEX, ~251bp), next JB1.2 (HEX ~388bp)

Allele 2 = TRBD1-TRBJ2.7 (FAM, ~313bp)

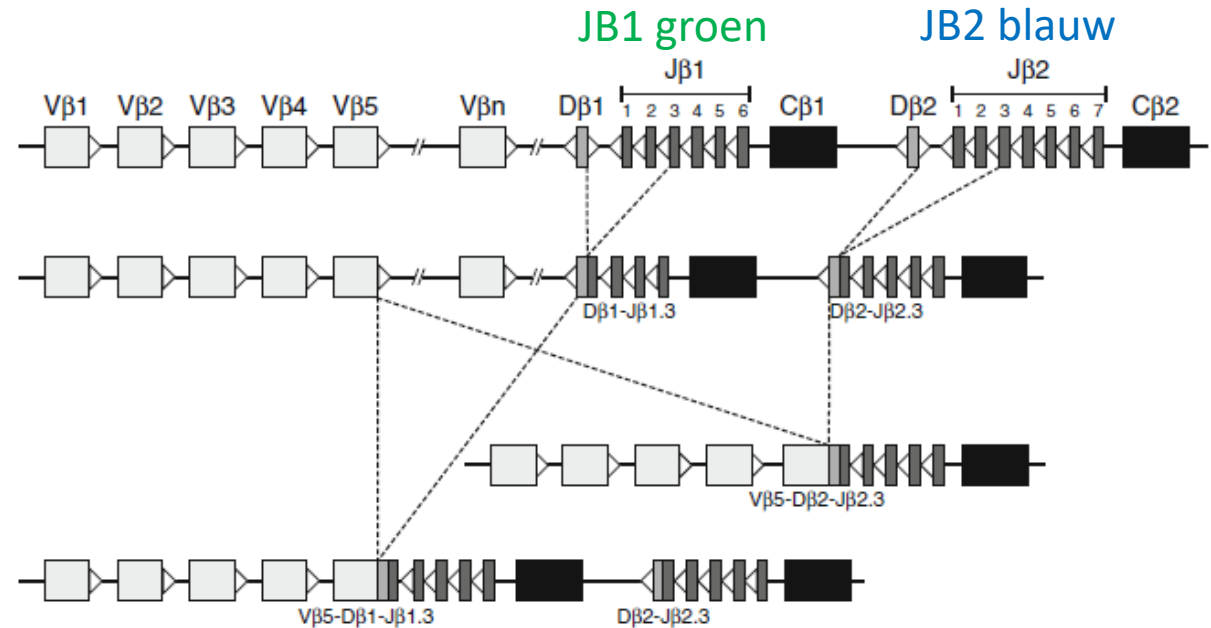
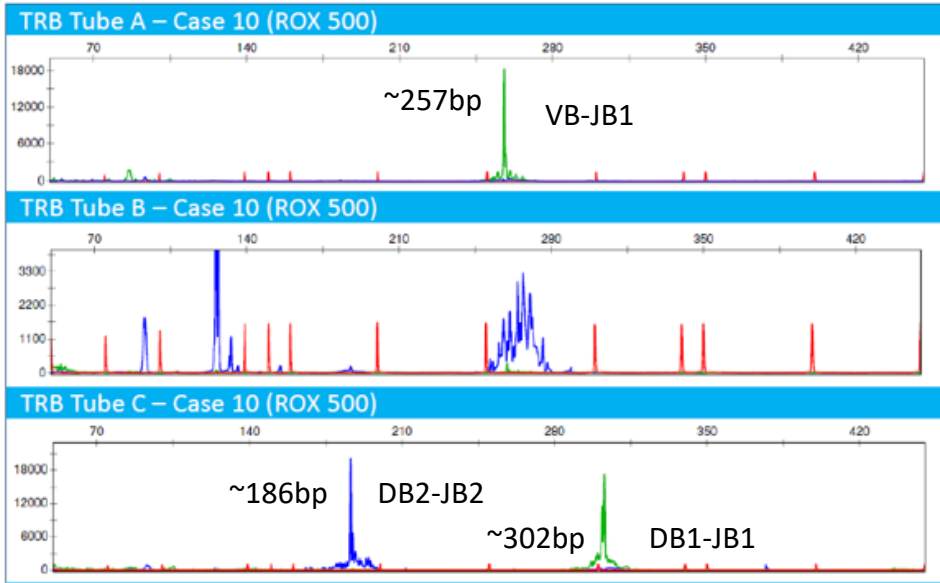
Germline afstand tussen JB1.1 en JB1.2 = 137bp (388-251 = 137bp)

Finale moleculaire interpretatie: biallelisch versus biklonaal

- klonaal (...nt)

- klonaliteit detecteerbaar

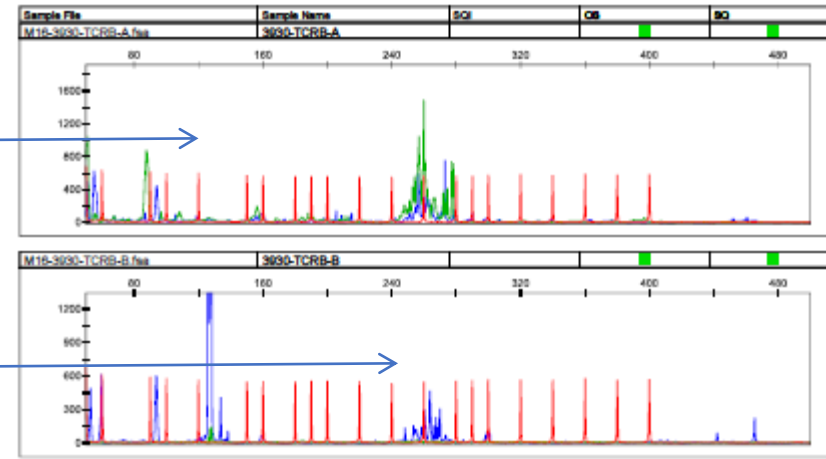
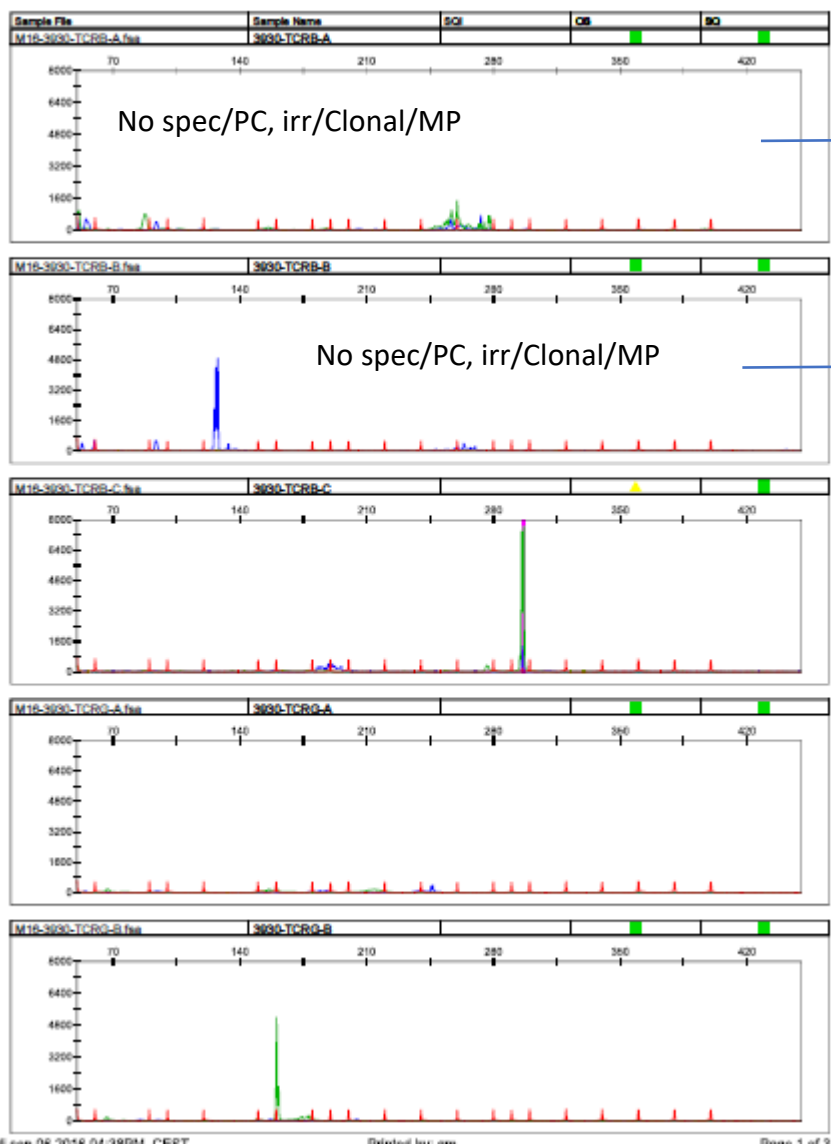
- klonaliteit detecteerbaar (biallelische producten)
- klonaliteit detecteerbaar (biklonaliteit)
- klonaliteit detecteerbaar (zwak klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (geïsoleerd klonaal product)
- klonaliteit detecteerbaar (terughoudendheid vereist, met advies voor follow-up analyse / nieuw monster)
- klonaliteit detecteerbaar met B- / T-cel achtergrond



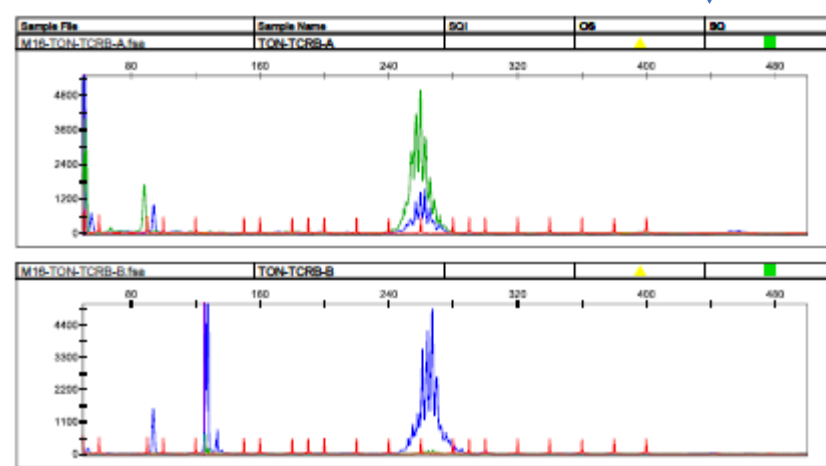
TRB locus: clonal, biallelic

Allele 1 = VB-JB1 (HEX, ~257bp) + DB2-JB2 (FAM ~186bp)
Allele 2 = DB1-JB1 (HEX, ~302bp)

Finale moleculaire interpretatie: NIET overinterpreteren!



Very few 'normal' T-cells left as compared to normal PC pattern

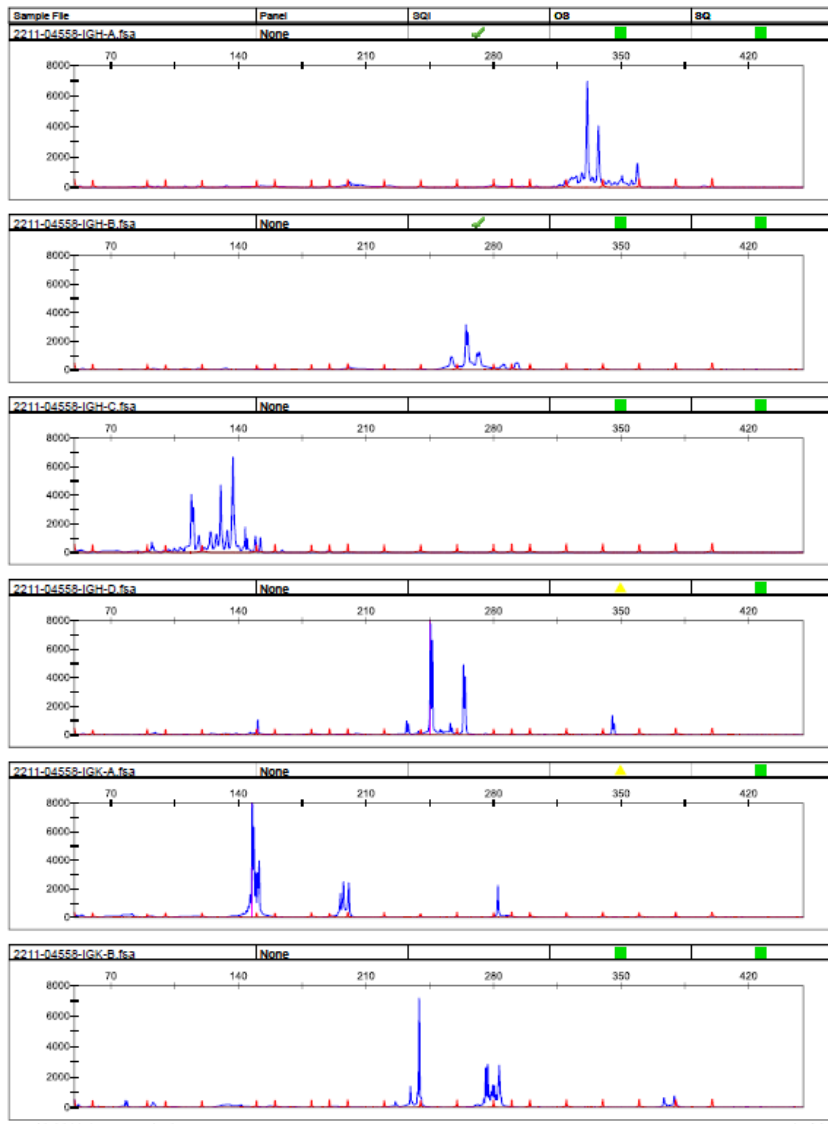


Finale moleculaire interpretatie: Oligoklonaliteit

- meerdere reproduceerbare producten ($n \geq 3$)^b

- oligoklonaliteit / meerdere klonen detecteerbaar

- dominante kloon in oligo/polyklonale achtergrond



IGH Locus > 3 x VDJ en 2x DJ
IGH Locus > minstens 3 klonen, tot 5

Oligoklonaal

Immuunactivatie

IGK Locus > 8-tal pieken > meer dan 2 klonen

Voorwaarden voor goede interpretatie van klonaliteitsanalyses

- Goede kennis van de genetische opbouw van de IG en TR genherschikkingen
- Goede kennis van de setup van de verschillende PCR-reacties en de mogelijke technische pitfalls:
 - effect van staalkwaliteit
 - effect van analyse settings
 - specifieke pieken
 - effect van somatische hypermutatie bij IGH
 - verschillende pieken van zelfde herschikking
 - Cross-annealing van primers
- Goede kennis van het normale B- of T-cel repertoire in verschillende weefsels

Ons oligoklonale team!

