

Gebrauchsanweisung



IdentiClone® *TCRB* Gene Clonality Assay

Zur Identifizierung von klonalen Umlagerungen des Gens für die Beta-Kette des T-Zell-Rezeptors.



In-vitro-Diagnostikum



Lagerbedingungen: -85°C bis -65°C

(DNA-Kontrollen können aus den Assay-Kits genommen und bei 2°C bis 8°C gelagert werden)

Katalognummer	Produkte	Menge
REF 92050011	IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Reaktionen
REF 92050021	IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Reaktionen

Inhaltsverzeichnis

1.	VERWENDUNGSZWECK.....	3
2.	ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES ASSAYS.....	3
2.1.	Hintergrund.....	3
2.2.	Zusammenfassung.....	3
3.	VERFAHRENSGRUNDLAGEN	4
3.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	4
3.2.	Differentielle Fluoreszenzdetektion.....	4
4.	REAGENZIEN	5
4.1.	Reagenzienbestandteile.....	5
4.2.	Warn- und Vorsichtshinweise	6
4.3.	Lagerung und Handhabung	6
5.	INSTRUMENTE.....	7
5.1.	Thermocycler.....	7
5.2.	ABI-Kapillarelektrophorese-Geräte.....	7
6.	GEWINNUNG UND AUFBEREITUNG VON PROBEN.....	8
6.1.	Vorsichtsmaßnahmen	8
6.2.	Störsubstanzen	8
6.3.	Probenanforderung und -handhabung	8
6.4.	Probenvorbereitung.....	8
6.5.	Probenlagerung.....	8
7.	ASSAY-VERFAHREN	9
7.1.	Im Lieferumfang enthaltene Materialien	9
7.2.	Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien	9
7.3.	Vorbereitung der Reagenzien	10
7.4.	Amplifikation	11
7.5.	ABI-Fluoreszenzdetektion.....	12
7.6.	Qualitätskontrolle.....	12
7.7.	Empfohlene Positivkontrollen.....	13
8.	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE.....	13
8.1.	Analyse.....	13
8.2.	Probeninterpretation	14
9.	VERFAHRENSEINSCHRÄNKUNGEN	14
10.	ERWARTUNGSWERTE.....	14
10.1.	Erwartete Länge der amplifizierten Produkte	14
10.2.	Beispieldaten	15
11.	LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN.....	16
12.	TECHNISCHER SUPPORT UND KUNDENDIENST	17
13.	BIBLIOGRAPHIE.....	17
14.	SYMBOLE.....	17
15.	HAFTUNGSHINWEIS	18
15.1.	Garantie und Haftung.....	18
15.2.	Patente und Marken	18

1. Verwendungszweck

Der IdentiClone *TCRB* Gene Clonality Assay ist ein *In-vitro*-Diagnostikum für die PCR-basierte Detektion klonaler Umlagerungen des Gens für die Beta-Kette des T-Zell-Rezeptors bei Patienten, bei denen Lymphproliferationen vermutet werden. Insbesondere kann der *TCRB* Gene Clonality Assay für folgende Zwecke verwendet werden:

- Identifizierung von Klonalität bei vermuteter Lymphproliferation
- Unterstützung einer Differentialdiagnose zwischen reaktiven Läsionen und bestimmten Malignitäten unreifer B-Zellen
- Bestimmung der involvierten Abstammungslinien bei lymphoproliferativen Erkrankungen ausgereifter Zellen
- Überwachung und Beurteilung von Krankheitsrückfällen

2. Zusammenfassung und Erläuterung des Assays

2.1. Hintergrund

Rearrangements der Antigenrezeptor-Gene treten während der Ontogenese bei B- und T-Lymphozyten auf. Durch diese Genumlagerungen entstehen für jede Zelle einzigartige Produkte in ihrer Länge und Sequenz. Daher können Polymerase-Kettenreaktion(PCR)-Assays zur Identifizierung von einer einzigen Zelle abstammenden Lymphozytenpopulationen eingesetzt werden. Hierfür werden die in den entsprechenden Antigenrezeptor-Loci vorhandenen einzigartigen V-J-Genumlagerungen nachgewiesen.¹ Dieser IdentiClone PCR-Assay verwendet mehrere Konsensus-DNA-Primer, die an die konservierten Genregionen im Gen für die Beta-Kette des T-Zell-Rezeptors binden. Dieser DNA-basierte Assay wird für den Nachweis der überwiegenden Mehrheit klonaler T-Zell-Malignitäten verwendet. Die Assayprodukte können mithilfe einer Reihe von Detektionsmethoden, einschließlich Gel- und Kapillarelektrophorese, analysiert werden.

Die Genumlagerungsanalyse kann auch durch Southern Blot (SB) basierende Techniken durchgeführt werden. Obwohl die SB-Analyse sehr zuverlässig ist, wird sie aufgrund der größeren Effizienz und Sensitivität der PCR zunehmend durch PCR-Techniken ersetzt. Darüber hinaus ist PCR relativ einfach, weniger arbeitsintensiv und erfordert viel geringere Mengen an DNA mit hohem Molekulargewicht als SB-Tests. Darüber hinaus kann PCR häufig an DNA durchgeführt werden, die aus in Paraffin eingebettetem Gewebe isoliert wurde, während SB nicht durchgeführt werden kann, da die DNA häufig abgebaut ist. Daher besteht ein starker Bedarf, die SB-Analyse durch zuverlässige PCR-Techniken zu ersetzen.

2.2. Zusammenfassung

IdentiClone-Assays von Invivoscribe bieten einen neuen Ansatz für PCR-basierte Klonalitätsassays. Diese Standardassays werden sorgfältig unter Testen positiver und negativer Kontrollproben mit Multiplex-Master-Mixen optimiert. Nach der Entwicklung des Assays wurde dieser ausgiebig validiert, einschließlich durch Testen von mehr als 400 klinischen Proben mithilfe der REAL-Klassifizierung (Revised European/American Lymphoma). Die Tests wurden in einer Kooperationsstudie mit dem Namen BIOMED-2 Concerted Action an mehr als dreißig bekannten unabhängigen Testzentren in Europa durchgeführt.²

Die Assays, die auf ABI-Nachweis basieren, können klonale Populationen unter 1 % der Gesamtpopulation der Lymphozytenzellen nicht zuverlässig erfassen. Die Ergebnisse molekularer Klonalitätstests müssen immer unter Berücksichtigung klinischer, histologischer und immunphänotypischer Daten interpretiert werden.

Das Assaykit umfasst vier (4) Master-Mixe. Der *TCRB* Tubes A und B (TCRB-Röhrchen A und B) zielen auf Gerüstregionen (Framework, FR) in der variablen Region (V) und in der Verbindungsregion (joining, J) des Locus der Beta-Kette des TCR ab. *TCRB* Tube C (TCRB-Röhrchen C) zielt auf die Diversität und Verbindungsregionen ab. Zuletzt der Specimen Control Size Ladder Master Mix (Master-Mix der Probenkontroll-Größenleiter) amplifiziert mehrere Gene und erzeugt eine Reihe von Amplikons von ca. 96, 197, 297, 397 und 602 Basenpaaren (base pairs, bp), um sicherzustellen, dass Qualität und Quantität der eingesetzten DNA für den Erhalt eines gültigen Ergebnisses ausreichend sind. Bei allen unseren Assays zur Genklonalität werden ein einziges Thermocycler-Programm und ähnliche Detektionsmethoden verwendet. Dies verbessert die Vergleichbarkeit und ermöglicht die Schulung an einem breiten Spektrum verschiedener Assays.

Dieser Assay basiert auf der Euroclonality/BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.



3. Verfahrensgrundlagen

3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Assays werden routinemäßig zur Identifizierung von klonalen T-Zell-Populationen verwendet. Diese Tests amplifizieren die DNA zwischen Primern, die auf die konservierten variablen (V) Regionen und die konservierten Verbindungsregionen (J) (TCRB-Röhrchen A und B) sowie die Diversitäts- (D) und Verbindungsregionen (TCRB-Röhrchen C) abzielen. Diese konservierten Regionen liegen auf beiden Seiten eines Bereichs innerhalb der V-J-Region, wo während der Reifung aller B- und T-Lymphozyten programmierte genetische Umlagerungen auftreten. Die Antigen-Rezeptor-Gene, die einer Umlagerung unterliegen, sind die Immunglobulin-Schwerkette und -Leichtketten in B-Zellen und die T-Zell-Rezeptor-Gene in T-Zellen. Jede B- und T-Zelle hat eine einzige produktive V-J-Umlagerung, die sowohl in Länge als auch Sequenz einzigartig ist. Wenn daher DNA aus einer normalen oder polyklonalen Population unter Verwendung von DNA-Primern amplifiziert wird, die die V-J-Region flankieren, wird eine glockenförmige Kurve (Gaußsche Verteilung) von Amplicon-Produkten innerhalb eines erwarteten Größenbereichs erzeugt. Auf einem Gel wird diese Produktverteilung als Verschmierung visualisiert. Diese Gaußsche Verteilung spiegelt die heterogene Population von V-J-Umlagerungen wider. (In bestimmten Fällen, in denen keine Lymphozyten-DNA vorhanden ist, wird kein Produkt gesehen.) Bei DNA aus Proben, die eine klonale Population enthalten, beträgt die Ausbeute ein oder zwei deutliche amplifizierte Produkte (Amplikons) innerhalb eines verringerten polyklonalen Hintergrunds.

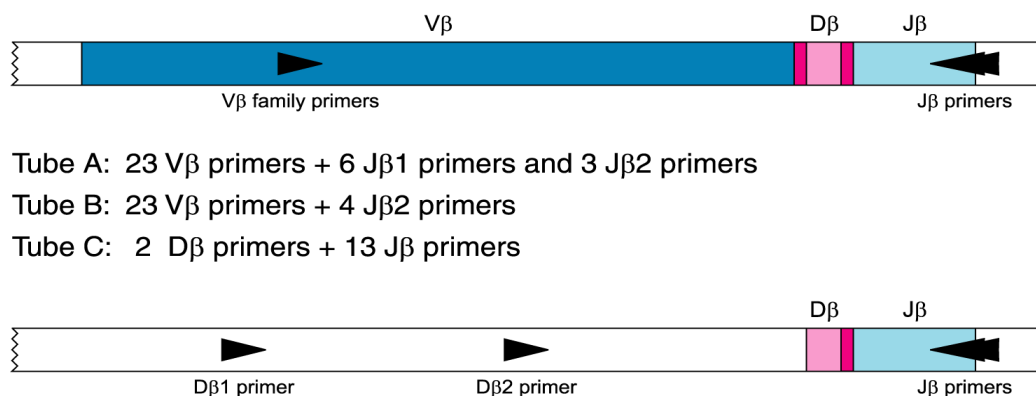


Abbildung 1. Dies ist ein vereinfachtes Diagramm eines repräsentativen umgelagerten T-Zell-Rezeptor-Beta-Gens auf Chromosom 7 (7q35), das die ungefähre Position der davor und danach bindenden DNA-Primer zeigt. Die Anzahl der Primer und deren jeweilige Spezifitäten sind für den Master-Mix im TCRB Tubes (TCRB-Röhrchen A, B und C) gelistet.

Tube A: 23 Vβ primers + 6 Jβ1 primers and 3 Jβ2 primers

Tube B: 23 Vβ primers + 4 Jβ2 primers

Tube C: 2 Dβ primers + 13 Jβ primers

Da die Antigen-Rezeptor-Gene polymorph sind (bestehend aus einer heterogenen Population verwandter DNA-Sequenzen), ist es schwierig, einen einzelnen Satz von DNA-Primersequenzen zu verwenden, um alle konservierten flankierenden Regionen um die V-J-Umlagerung abzudecken. Durch N-Region-Diversität und somatische Mutation entsteht in den DNA-Sequenzen in diesen Regionen weitere Vielfalt. Daher sind Multiplex-Master-Mixe, die mehrere FR-Regionen zum Ziel haben, erforderlich, um die Mehrzahl von klonalen Umlagerungen zu erkennen. Wie bereits erwähnt, werden klonale Umlagerungen als prominente Produkte einer einzigen Größe vor dem Hintergrund unterschiedlich großer Ampliconprodukte identifiziert, welche rund um die statistisch bevorzugte und durchschnittlich große Umlagerung eine Gaußsche Normalverteilung bilden.

3.2. Differentielle Fluoreszenzdetektion

Die differentielle Fluoreszenzdetektion wird üblicherweise verwendet, um die Ampliconprodukte unterschiedlicher Größe mithilfe eines Kapillarelektrophorese-Geräts zu trennen. Primer können mit mehreren verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorophore) konjugiert werden, sodass diese nach Anregung mit einem Laser im Kapillarelektrophorese-Gerät verschiedene Emissionsspektren erzeugen. Auf diese Weise können unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedlichen Zielregionen entsprechen. Dieses Nachweissystem bietet eine unübertroffene Empfindlichkeit, Auflösung einzelner Nukleotide, Nachweis differentieller Produkte und relative Quantifizierung. Darüber hinaus kann die Verwendung von Agarose- und Polyacrylamidgelen sowie die Verwendung von Karzinogenen wie Ethidiumbromid praktisch ausgeschlossen werden. Darüber hinaus ermöglicht der differentielle Nachweis eine genaue, reproduzierbare und objektive Interpretation von primerspezifischen Produkten und eine automatische Archivierung der Daten. Die Inter- und Intra-Assay-Reproduzierbarkeit bei der Größenbestimmung mittels Kapillarelektrophorese liegt bei etwa 1 bis 2 Basenpaaren (bp). Diese Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit in Verbindung mit der automatischen Archivierung von Probanddaten ermöglicht die Überwachung, Nachverfolgung und den Vergleich von Daten einzelner Patienten im Zeitverlauf.

4. Reagenzien

4.1. Reagenzienbestandteile

Tabelle 1. Verfügbare Kits

Katalognummer	Beschreibung	Menge
REF 92050011	IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Reaktionen
REF 92050021	IdentiClone <i>TCRB</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Reaktionen

Tabelle 2. Reagenzienbestandteile

Reagenz	Katalognummer (REF)	Reagenzienbestandteile (Wirkstoffe)	Mengen- einheit	92050011 Anzahl der Einheiten	92050021 Anzahl der Einheiten	Lagerungs- temp.
Master-Mixe	22050011CE	<i>TCRB</i> Tube A (TCRB-Röhrchen A) – 6FAM Mehrere Oligonukleotide, die an die Regionen V β + J β 1 + J β 2 des Gens für die Beta-Kette des T-Zell-Rezeptors binden, gepuffert in einer Salzlösung.	1500 μ L	1	10	 -85 °C – -65 °C
	22050021CE	<i>TCRB</i> Tube B (TCRB-Röhrchen B) – 6FAM Mehrere Oligonukleotide, die an die Regionen V β + J β 2 des Gens für die Beta-Kette des T-Zell-Rezeptors binden, gepuffert in einer Salzlösung.	1500 μ L	1	10	
	22050031CE	<i>TCRB</i> Tube C (TCRB-Röhrchen C) – 6FAM & HEX Mehrere Oligonukleotide, die an die Regionen D β + J β 1 + J β 2 des Gens für die Beta-Kette des T-Zell-Rezeptors binden, gepuffert in einer Salzlösung.	1500 μ L	1	10	
Master-Mix für die Amplifikationskontrolle	20960021	Specimen Control Size Ladder (Probenkontroll-Größenleiter) – 6FAM Mehrere Oligonukleotide, die an Housekeeping-Gene binden.	1500 μ L	1	10	
Positiv-Kontroll-DNA	40880490	IVS-0009 Clonal Control DNA (klonale Kontroll-DNA) 200 μ g/mL DNA in 1/10 TE	100 μ L	1	5	 2 °C – 8 °C oder -85 °C
	40880190	IVS-0004 Clonal Control DNA (klonale Kontroll-DNA) 200 μ g/mL DNA in 1/10 TE	100 μ L	1	5	
	40881210	IVS-0021 Clonal Control DNA (klonale Kontroll-DNA) 200 μ g/mL DNA in 1/10 TE	100 μ L	1	5	
Negative (normale) Kontroll-DNA	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (polyklonale Kontroll-DNA) 200 μ g/mL DNA in 1/10 TE	100 μ L	1	5	

Hinweis: Bei der Herstellung dieses Kits werden keine Konservierungsstoffe verwendet.

4.2. Warn- und Vorsichtshinweise

- **IVD** Dieses Produkt ist zur Verwendung in der *In-vitro*-Diagnostik bestimmt.
- Verwenden Sie dieses Assay-Kit als System. Verwenden Sie keine Reagenzien anderer Hersteller. Verdünnung, Reduzierung der Amplifikationsreaktionsvolumina und andere Abweichungen vom vorliegenden Protokoll können sich auf die Testergebnisse auswirken und/oder zur Ungültigkeit beschränkter Unterlizenzen führen, die mit dem Erwerb dieses Kits bereitgestellt werden.
- Die Materialien sind bis Ablauf des aufgedruckten Verfallsdatums stabil, wenn Handhabung und Lagerung wie hier beschrieben erfolgen. Kits nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Optimale Leistung und Reproduzierbarkeit können nur bei genauer Einhaltung des Protokolls gewährleistet werden. Es ist darauf zu achten, das korrekte Thermocycler-Programm zu verwenden, da andere Programme zu inkorrekten/fehlerhaften Daten, wie falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen, führen können.
- Reagenzien aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern nicht kombinieren.
- Es ist darauf zu achten, bei der Arbeit mit Proben eine persönliche Schutzausrüstung zu tragen, sich an die Richtlinien der guten Laborpraxis zu halten und die allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen anzuwenden. Proben sollten in zugelassenen biologischen Sicherheitsbereichen gehandhabt und nur in zugelassenen Sicherheitswerkbänken geöffnet werden. Für die Vorbereitung von DNA-Proben ist Wasser in Molekularbiologie-Qualität zu verwenden.
- Aufgrund der analytischen Sensitivität dieses Tests ist die Kontamination der Reagenzien oder Amplifikationsmische durch Proben, Kontrollen oder amplifiziertes Material unbedingt zu vermeiden. Sämtliche Reagenzien sind auf Anzeichen einer Kontamination hin zu überwachen (z. B. Negativkontrollen, die positive Signale geben). Reagenzien, bei denen der Verdacht einer Kontamination besteht, sind zu entsorgen.
- Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos, Handschuhe tragen wenn Proben und Reagenzien verarbeitet werden, und Arbeitsbereiche und Pipetten vor der PCR regelmäßig reinigen.
- Autoklavieren beseitigt keine DNA-Kontamination. Der Arbeitsablauf im PCR-Labor sollte stets unidirektional ablaufen; zunächst Vorbereitung des Master-Mixes, anschließend Probenaufreinigung, dann Amplifikation und abschließend Detektion. Amplifizierte DNA sollte nicht in den Bereich gebracht werden, der für die Zubereitung der Master-Mixe oder Proben vorgesehen ist.
- Alle in einem bestimmten Laborbereich verwendeten Pipetten, Pipettenspitzen und anderen Ausstattungen müssen in diesem Laborbereich verbleiben.
- Wann immer möglich, ist zur Vermeidung einer Kontamination mit RNase oder DNase oder einer Kreuzkontamination steriles Einweg-Plastik zu verwenden.

4.3. Lagerung und Handhabung

- Sofern die Assay-Kits nicht sofort verwendet werden, **sind diese bei -85°C bis -65°C zu lagern.**
- Die optimale Lagertemperatur für DNA-Kontrollen beträgt 2°C bis 8°C, DNA-Kontrollen können jedoch auch bei Temperaturen von -85°C bis -65°C gelagert werden.
- Alle Reagenzien und Kontrollen müssen vor der Verwendung aufgetaut und gevortext oder gründlich gemischt werden, um sicherzustellen, dass sie vollständig resuspendiert wurden. Übermäßiges Mischen auf dem Vortex kann die DNA scheren und dazu führen, dass markierte Primer ihre Fluorophore verlieren.
- Die Materialien sind bis Ablauf des aufgedruckten Verfallsdatums stabil, wenn Handhabung und Lagerung wie hier beschrieben erfolgen. Kits nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Aufgrund ihrer hohen Salzkonzentrationen sind PCR-Master-Mixe empfindlich gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen. Master-Mixe, falls erforderlich, in sterile Röhrchen mit Schraubdeckel mit O-Ring aliquotieren.

5. Instrumente

5.1. Thermocycler

- Zweck oder Funktion: Amplifikation von DNA-Proben
- Empfohlenes Instrument: Veriti™ Thermocycler oder gleichwertig
- Leistungseigenschaften und Spezifikation:
 - Temperaturbereich (Minimum): 15°C bis 96°C
 - Mindestheizrate: 0,8°C/s
- Befolgen Sie die Installations-, Betriebs-, Kalibrierungs- und Wartungsanweisungen des Herstellers.
- Angaben zum Thermocyclerprogramm finden Sie in Abschnitt 7.4 *Amplifikation*.

5.2. ABI-Kapillarelektrophorese-Geräte

- Verwendung oder Funktion: Detektion und Analyse von Fragmenten
- Die folgenden Kapillarelektrophorese-Geräte erfüllen die Leistungsanforderungen für diesen Assay:
 - ABI 310 Avant Genetic Analyzer (1-capillary) (Genanalysator [1 Kapillaren])
 - ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (4-capillaries) (Genanalysator [4 Kapillaren])
 - ABI 3100 Genetic Analyzer (16-capillaries) (Genanalysator [16 Kapillaren])
 - ABI 3130 Genetic Analyzer (4-capillaries) (Genanalysator [4 Kapillaren])
 - ABI 3130xL Genetic Analyzer (16-capillaries) (Genanalysator [16 Kapillaren])
 - ABI 3500 Genetic Analyzer (8-capillaries) (Genanalysator [8 Kapillaren])
 - ABI 3500xL Genetic Analyzer (24-capillaries) (Genanalysator [24 Kapillaren])
- Befolgen Sie die Installations-, Betriebs-, Kalibrierungs- und Wartungsanweisungen des Herstellers.
- Das verwendete ABI-Gerät muss mit den geeigneten Matrix Standards gemäß Beschreibung in Abschnitt 7.2: *Nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien* kalibriert werden.
- Es sind die Standardeinstellungen für den jeweiligen Polymer- und Kapillartyp zu verwenden.
- Angaben zur Probenvorbereitung finden Sie in Abschnitt 7.5 *ABI-Fluoreszenzdetektion*.

6. Gewinnung und Aufbereitung von Proben

6.1. Vorsichtsmaßnahmen

Biologische Proben von Menschen können potenziell infektiöse Stoffe enthalten. Sämtliche Proben sind gemäß der OSHA-Richtlinie zu über den Blutweg übertragenen Krankheitserregern bzw. biologischer Schutzstufe 2 zu handhaben.

6.2. Störsubstanzen

Folgende Substanzen stören bekanntermaßen die PCR:

- zweiwertige Kationenchelatoren
- Low-Retention-Pipettenspitzen
- EDTA (in geringen Konzentrationen zu vernachlässigen)
- Heparin

6.3. Probenanforderung und -handhabung

Mit diesem Assay kann **genomische DNA** (gDNA) aus den folgenden Quellen getestet werden:

- 5 ml peripheres Blut, Knochenmarkbiopsien oder Knochenmarkaspirat mit Heparin oder EDTA als Antikoagulant (gelagert bei 2°C bis 8°C und Versand bei Umgebungstemperatur)
- Gewebe mit Kantenlängen von mindestens 5 mm (Versand und Lagerung in gefrorenem Zustand oder in RPMI 1640 bei Umgebungstemperatur oder auf Eis)
- 2 µg genomische DNA (gelagert bei 2°C bis 8°C und Versand bei Umgebungstemperatur)
- formalinfixierte und paraffin-eingebettete Gewebeproben oder Probenträger (Lagerung und Versand bei Umgebungstemperatur)

6.4. Probenvorbereitung

Die gDNA so schnell wie möglich aus Patientenproben extrahieren. Die DNA auf eine Endkonzentration von 100 µg bis 400 µg pro ml in 1/10 TE (1 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) oder in für die Molekularbiologie geeignetem oder USP-Wasser resuspendieren. Es handelt sich um ein robustes Testsystem. Ein gültiges Ergebnis wird mit einem großen Bereich von DNA-Konzentrationen erzielt. Daher sind im Allgemeinen keine Quantifizierung und Anpassung der DNA-Konzentrationen erforderlich. Durch Testen der Proben-DNA mit dem Specimen Control Size Ladder Master Mix (Master-Mix mit der Probenkontroll-Größenleiter) wird sichergestellt, dass DNA von ausreichender Qualität und Quantität vorhanden war, um ein gültiges Ergebnis zu erzielen.

6.5. Probenlagerung

Bewahren Sie die genomische DNA bei 2°C bis 8°C oder für einen längeren Zeitraum bei -85°C bis -65°C auf.

7. Assay-Verfahren

7.1. Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Tabelle 3: Kit-Bestandteile

Katalognummer	Beschreibung
REF 22050011CE	TCRB Tube A (TCRB-Röhrchen A) – 6FAM
REF 22050021CE	TCRB Tube B (TCRB-Röhrchen B) – 6FAM
REF 22050031CE	TCRB Tube C (TCRB-Röhrchen C) – 6FAM & HEX
REF 20960021	Specimen Control Size Ladder (Probenkontroll-Größenleiter) – 6FAM
REF 40881210	IVS-0021 Clonal Control DNA (klonale Kontroll-DNA)
REF 40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (polyklonale Kontroll-DNA)

7.2. Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Tabelle 4: Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Reagenz/Material	Empfohlene Reagenzien/Materialien und Anbieter	Katalognummer (REF)	Anmerkungen
DNA-Polymerase	Roche: - EagleTaq DNA Polymerase (DNS-Polymerase) Invivoscribe, Inc.: - FalconTaq DNA Polymerase (DNS-Polymerase) oder gleichwertige Polymerase	05206944190 60970130	keine Angabe
Glasdestilliertes, entionisiertes, hochreines Wasser für die Molekularbiologie oder USP-Wasser	keine Angabe	keine Angabe	frei von DNase und RNase
Kalibrierte Pipetten	Rainin: - P-2-, P-20-, P-200- und P-1000-Pipetten - oder SL-2-, SL-20-, SL-200- und SL-1000-Pipetten	keine Angabe	müssen für die genaue Messung von Volumen zwischen 1 µL und 1000 µL geeignet sein
Thermocycler	Thermo Fisher Scientific: - Veriti Dx Thermal Cycler Bio-Rad: - MJ Research PTC-100 oder PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer - PE 9600 oder PE 9700	keine Angabe	keine Angabe
Vortexmischer	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
PCR-Platten oder -Röhrchen	keine Angabe	keine Angabe	steril
Pipettenspitzen mit Filter	keine Angabe	keine Angabe	steril, ohne RNase/DNase/Pyrogene
Mikrozentrifugengefäße	keine Angabe	keine Angabe	steril
ABI-Kapillar-elektrophorese-Gerät	Thermo Fisher Scientific: ABI 310-, 3100- oder 3500-Serie	keine Angabe	keine Angabe
Hi-Di-Formamid	Thermo Fisher Scientific: Hi-Di™-Formamid	4311320	keine Angabe
Längenstandards	Invivoscribe, Inc.: - Hi-Di Formamide mit ROX-Größenstandards für ABI 3100 Thermo Fisher Scientific: - für Instrumente der Serie ABI 3100 oder 3130: - GeneScan™ - 400HD [ROX]™ - für Instrumente der Serie ABI 3500: - GeneScan - 600 [LIZ]™ v2.0	60980061 402985 4408399	keine Angabe

Tabelle 4: Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Reagenz/Material	Empfohlene Reagenzien/Materialien und Anbieter	Katalognummer (REF)	Anmerkungen
Dye Set für spektrale Kalibrierung	Thermo Fisher Scientific: - für Instrumente der Serie ABI 3100 oder 3130: - DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D) (Matrix-Standard-Kit [Farbstoffset D]) - für Instrumente der Serie ABI 310: - NED Matrix Standard und Fluorescent Amidite Matrix Standards [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX] - für Instrumente der Serie ABI 3500: - DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5) (Matrix-Standard-Kit [Farbstoffset G5])	4345827 402996 401546 4345833	keine Angabe
Polymer	Thermo Fisher Scientific: - POP-4™-Polymer: - POP-4 für 310 Genetic Analyzers - POP-4 für 3100/3100-Avant Genetic Analyzers - POP-4 für 3130/3130xL Genetic Analyzers - POP-7™-Polymer: - POP-7 für 3130/3130xL Genetic Analyzers - POP-7 für 3500/3500xL Genetic Analyzers	402838 4316355 4352755 4352759 4393714	keine Angabe
Puffer	Thermo Fisher Scientific: 10X Puffer für Genanalysatoren mit EDTA	402824	Vor dem Gebrauch mit sterilem Wasser auf 1:10 verdünnen.

7.3. Vorbereitung der Reagenzien

- Alle unbekannten Proben können mit dem Specimen Control Size Ladder-Mastermix getestet werden, um sicherzustellen, dass keine Amplifikationsinhibitoren vorhanden sind und DNA in ausreichender Qualität und Menge vorhanden ist, um ein gültiges Ergebnis zu erzielen.
- Einzelne Testergebnisse sind gültig; Testen Sie jedoch nach Möglichkeit doppelt. Wenn Doppeltests zu widersprüchlichen Ergebnissen führen, ist ein erneuter Test oder eine erneute Bewertung der Probe erforderlich.
- Testen Sie positive, negative und keine Template-Kontrollen für jeden Master-Mix.
- Stapeln Sie mehrere Proben in einem Lauf, um zu vermeiden, dass die Negativkontrolle (IVS-0000 polyklonale Kontroll-DNA) ausgeht. Wenn das Batching von Proben in Ihrer Laborumgebung nicht praktikabel ist, ist IVS-0000 Polyclonal Control DNA auch separat erhältlich.

7.3.1. Mit behandschuhten Händen Master-Mixe aus dem Gefrierschrank nehmen. Röhrcheninhalte vollständig auftauen lassen; zum Mischen leicht vortexen.

7.3.2. Unter einer Schutzhaube oder in einer Dead-Air-Box ein ausreichendes Aliquot von jedem Master-Mix in individuelle saubere und sterile Mikrozentrifugengefäße geben.

- Das Volumen der Aliquots beträgt für jede Reaktion 45 µL.
- Schließen Sie für jeweils 15 Reaktionen eine zusätzliche Reaktion ein, um Pipettierfehler zu korrigieren.
- Somit beträgt die Anzahl der Reaktionen (**n**) für jeden Mastermix (mit Ausnahme der Probenkontrollgrößenleiter):

n = 2 × Anzahl an Proben	(jede Probe im Duplikat durchführen)
+ 1	Positiv-Kontroll-DNA (siehe Tabelle 6)
+ 1	Negativ-Kontroll-DNA (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	Nicht-Template-Kontrolle (Wasser)
+ 1	zum Ausgleich von Pipettierfehlern

n = 2 × Anzahl an Proben + 4 gesamt

- Daher sollte das Aliquot-Gesamtvolumen für jeden Master-Mix = **n x 45 µL** betragen.
- Die Anzahl der Reaktionen (**m**) für den Specimen Control Size Ladder Master Mix beträgt daher:

m = Anzahl an Proben	(jede Probe im Duplikat durchführen)
+ 1	Positiv-Kontroll-DNA (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	Nicht-Template-Kontrolle (Wasser)
+ 1	zum Ausgleich von Pipettierfehlern

m = Anzahl an Proben + 3 gesamt

- Daher sollte das Aliquot-Gesamtvolumen für jeden Master-Mix der Specimen Control Size Ladder = **m x 45 µL** betragen.

- 7.3.3. Für **TCRBTube A und Tube B (TCRB-Röhren A und B)**: 2,25 U (oder 0,45 µL bei 5 U/µL) Taq-DNA-Polymerase pro Reaktion zu jedem Master-Mix hinzugeben.
- Das Gesamtvolumen der zu jedem Master-Mix hinzugegebenen Taq-DNA-Polymerase beträgt = $n \times 0,45 \mu\text{L}$.
 - Zum Vermischen behutsam vortexen.
- 7.3.4. Für **TCRBTube C (TCRB-Röhren C) und Specimen Control Size Ladder (Probenkontroll-Größenleiter)**: 1,25 U (oder 0,25 µL bei 5 U/µL) Taq-DNA-Polymerase pro Reaktion zu jedem Master-Mix hinzugeben.
- Die Gesamtmenge der jedem Master-Mix zugesetzten Taq-DNA-Polymerase beträgt $n \times 0,25 \mu\text{L}$ für den **TCRBTube C (TCRB-Röhrchen-C)** Master-Mix und $m \times 0,25 \mu\text{L}$ für den Specimen Control Size Ladder-Master-Mix.
 - Zum Vermischen behutsam vortexen.
- 7.3.5. Für jede Reaktion 45 µL des relevanten Master-Mixes + DNA-Polymerase in individuelle Wells einer PCR-Platte oder in PCR-Röhrchen überführen.
- 7.3.6. 5 µL des entsprechenden Templates (Proben-DNA, positive Kontroll-DNA, negative Kontroll-DNA oder Wasser) in die einzelnen Wells mit den jeweiligen Master-Mix-Lösungen geben. Zum Mischen mehrmals auf- und abpipettieren.
- 7.3.7. Die PCR-Platte verschließen oder abdecken.
- Die Proben können nun auf einem Thermocycler amplifiziert werden.
- 7.3.8. Die PCR-Platten oder -Röhrchen können für bis zu 24 Stunden bei 2°C bis 8°C gelagert werden, sollte die Amplifikation nicht sofort nach der Probenvorbereitung durchgeführt werden können.

Schnellanleitung:

$n \times 45 \mu\text{L}$
 $n \times 0,25 \mu\text{L oder } 0,45 \mu\text{L}$

Für jeden Master-Mix und n Reaktionen Folgendes Vereinfachen:

Master-Mix
 Taq-DNA-Polymerase
 Zum Vermischen behutsam vortexen.
45 µL des Master-Mix + DNA-Polymerase-Lösung in jeden Well aliquotieren.
5 µL des entsprechenden Templates zu jedem Well hinzufügen.
50 µL

Gesamtreaktionsvolumen =

***Hinweis:**

Verwenden Sie 0,45 µL Taq-DNA-Polymerase für TCRB-Röhrchen A und B und 0,25 µL Taq-DNA-Polymerase für TCRB-Röhrchen C und Specimen Control Size Ladder

7.4. Amplifikation

- 7.4.1. Die Proben mit dem folgenden PCR-Programm amplifizieren:
- Verwenden Sie für die Temperaturmessung mit den BioRad MJ Research PTC-Thermocyclern die **berechnete** Option.

Tabelle 5: Programmierung des Thermocyclers

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	95°C	7 Minuten	1
2	95°C	45 Sekunden	35
3	60°C	45 Sekunden	
4	72°C	90 Sekunden	
5	72°C	10 Minuten	1
6	15°C	∞	1

- 7.4.2. PCR-Platte oder -Röhrchen aus dem Thermocycler nehmen.
- Obgleich amplifizierte DNA bei Raumtemperatur über einen längeren Zeitraum stabil ist, sollten die PCR-Produkte bis zur Detektion bei 2°C bis 8°C aufbewahrt werden.
 - Der Nachweis muss innerhalb von 30 Tagen nach der Amplifikation erfolgen.

7.5. ABI-Fluoreszenzdetektion

- Multiplexen von PCR-Produkten aus verschiedenen Master-Mixen zusammen wird nicht empfohlen, da dies die Gesamtempfindlichkeit des Assays reduziert.

Plattformen der Serien ABI 310, 3100 oder 3130:

- 7.5.1. In einem neuen Mikrozentrifugengefäß eine angemessene Menge (für ein Gesamtvolumen von 10 µL pro PCR-Reaktion) an Hi-Di Formamide mit ROX Size Standards mischen.^a Gut auf dem Vortex mischen.
- 7.5.2. In einer neuen 96-Well-PCR-Platte 10 µL Hi-Di-Formamid mit ROX-Größenstandards in die einzelnen Wells für jede Reaktion geben.
- 7.5.3. 1 µL jeder -Reaktion in jedes Well mit Hi-Di-Formamid mit ROX-Größenstandards übertragen.
 - Nur eine Probe pro Well zugeben.
 - Zum Mischen auf- und abpipettieren.
- 7.5.4. Die PCR-Platte oder -Röhrchen verschließen oder abdecken.
- 7.5.5. Die Proben für 2 Minuten bei 95°C hitzedenaturieren, dann für 5 Minuten auf Eis schockkühlen.
- 7.5.6. Für die Proben ein **Probenblatt** und eine **Injektionsliste** erstellen.
- 7.5.7. Die Proben auf einem ABI-Kapillarelektrophorese-Gerät gemäß dem Benutzerhandbuch trennen.
- 7.5.8. Das Profil und die Kontrollen überprüfen und einen Ergebnisbericht erstellen. (Siehe Abschnitte 8: *Auswertung der Ergebnisse* und 10: *Erwartungswerte* unten).
 - Die Daten werden automatisch als größen- und farbspezifische Peaks angezeigt.

ABI-3500-Plattformen:

Hinweis: Aufgrund von Unterschieden zwischen Geräten der ABI-3500-Plattform sind die Mengenangaben für Formamid, Proben und Größenstandard im Protokoll als Startpunkt anzusehen. Das Protokoll muss eventuell für spezifische ABI-3500-Plattformen optimiert werden.

- 7.5.9. In einem neuen Mikrozentrifugengefäß eine angemessene Menge (9,5 µL pro Reaktion) an Hi-Di-Formamid mit LIZ-Größenstandards mischen. Gut auf dem Vortex mischen.
- 7.5.10. In einer neuen 96-Well PCR-Platte 9,5 µL an Hi-Di-Formamid mit LIZ-Größenstandards in je ein Well für jede Reaktion geben.
- 7.5.11. 0,5 µL jeder Reaktion in die Wells mit Hi-Di-Formamid mit LIZ-Größenstandards übertragen.
 - Nur eine Probe pro Well zugeben.
 - Zum Mischen auf- und abpipettieren.
- 7.5.12. Die PCR-Platte verschließen oder abdecken.
- 7.5.13. Die Proben für 3 Minuten bei 95°C hitzedenaturieren, dann für 5 Minuten auf Eis schockkühlen.
- 7.5.14. Für die Proben ein Probenblatt und eine Injektionsliste erstellen.
- 7.5.15. Die Proben auf einem ABI-3500-Kapillarelektrophorese-Gerät gemäß dem Benutzerhandbuch vermessen.
 - Die Daten werden automatisch als größen- und farbspezifische Peaks angezeigt.
- 7.5.16. Das Profil und die Kontrollen überprüfen und einen Ergebnisbericht erstellen. (Siehe Abschnitte 8: *Auswertung der Ergebnisse* und 10: *Erwartungswerte*)

^a**Hinweis:** Informationen zum Mischen von Hi-Di-Formamid mit Größenstandards für verschiedene ABI-Instrumente finden Sie in der Produktbeilage von Applied Biosystems.

7.6. Qualitätskontrolle

Positiv- und Negativkontrolle (oder Normalkontrolle) werden im Kit mitgeliefert und können in einfacher Ausführung bei jeder Durchführung des Assays durchgeführt werden, um die Leistung des Assays sicherzustellen. Zusätzlich sollte außerdem eine Nicht-Template-Kontrolle (z. B. Wasser) durchgeführt werden, um auf Kontaminationen des Master-Mix oder Kreuzkontamination der Reaktionen aufgrund falscher steriler Arbeitsweise zu prüfen. Es kann auch zusätzlich eine Pufferkontrolle verwendet werden, um sicherzustellen, dass keine Kontamination des Puffers aufgetreten ist, der zum Resuspendieren der Proben verwendet wurde. Die Werte für die Positivkontrollen finden sich in Abschnitt 10. *Erwartete Größe amplifizierter Produkte*. Zusätzliche Kontrollen und Sensitivitätskontrollen (Verdünnungen Positivkontrollen in unserer Negativkontrolle) können bei Invivoscribe bestellt werden.

7.7. Empfohlene Positivkontrollen

Die aufgeführten Amplikon-Größen wurden mithilfe einer ABI-Plattform bestimmt. Die mit dem vorhandenen Kapillarelektrophorese-Gerät gemessenen Amplikon-Größen können sich je nach Detektionsplattform und Version der verwendeten Analyse-Software um 1 bis 4 bp von den aufgelisteten Größen unterscheiden. Nach der initialen Identifikation stimmt die Amplikongröße bei jedem Lauf auf jedem spezifischen Gerät überein. Diese Reproduzierbarkeit ist bei der Überwachung des Wiederauftretens von Krankheiten von großen Nutzen.

Hinweis: Die „Farbe“ gibt die Farbe der mit dem Master-Mix generierten Produkte an, wenn auf ABI-Fluoreszenzdetektionssystemen die Standard-Farbzuzuweisung verwendet wird.

Tabelle 6: Empfohlene Positivkontrollen

Master-Mix	Ziel	Farbe	Kontroll-DNA	Katalog-nummer	Produktgröße in bp
TCRB Tube A	Vβ + Jβ1/2	Blau (Jβ2.X) & Grün (Jβ1.X)	gültiger Längenbereich IVS-0009 Clonal Control DNA	--- 40880490	240 – 285 264
TCRB Tube B	Vβ + Jβ2	Blau (Jβ2.X)	gültiger Längenbereich IVS-0004 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	--- 40880190 40881210	240 – 285 253 267
TCRB Tube C	Dβ + Jβ1/2	Blau (Jβ2.X) & Grün (Jβ1.X)	gültiger Längenbereich IVS-0009 Clonal Control DNA	--- 40880490	170 – 210 (Dβ2), 285 – 325 (Dβ1) 264
Specimen Control Size Ladder	mehrere Gene	Blau	gültiger Längenbereich IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	96, 197, 297, 397 602^b 96, 197, 297, 397, 602 ^b

^a**Hinweis:** Da kleinere PCR-Fragmente bevorzugt amplifiziert werden, ist es nicht ungewöhnlich, dass das 602-bp-Fragment ein weniger starkes Signal aufweist oder ganz fehlt. Bei der ABI-Fluoreszenzdetektion wird der 602-bp-Peak bei normalen Durchgangszeiten möglicherweise nicht angezeigt. Darüber hinaus kann die Größe dieses Peaks um über 30 bp abweichen, wenn die Fragmentgröße mit GeneScan - 400HD [ROX]-Größenstandards extrapoliert wird.

8. Interpretation der Ergebnisse

Obgleich positive Ergebnisse stark auf eine Malignität hinweisen, sind sowohl positive als auch negative Ergebnisse im Kontext der Gesamtheit der klinischen Daten und Laborergebnisse auszuwerten. Der Größenbereich für jeden Master-Mix wurde durch Testen positiver und negativer Kontrollproben festgelegt. Für eine genaue und aussagekräftige Interpretation ist es wichtig, Peaks, die außerhalb des gültigen Größenbereichs für jeden Master-Mix auftreten, zu ignorieren.

8.1. Analyse

- 8.1.1. Proben, die nach einem wiederholten Assay nicht amplifizieren, sind wie folgt zu beschreiben: „Zu dieser Probe kann kein Ergebnis geliefert werden, da die DNA für die Analyse nicht die ausreichende Quantität oder Qualität aufwies“.
- 8.1.2. Der Assay ist bei Proben zu wiederholen, wenn die positiven oder negativen Kontrollreaktionen fehlschlagen.
- 8.1.3. Liefern im Duplikat analysierte Proben unterschiedliche Ergebnisse, sind die Proben erneut zu testen und/oder neu zu bewerten, um ein Vertauschen von Proben auszuschließen.
- 8.1.4. Es sind sämtliche Assay-Kontrollen vor der Bewertung der Probenergebnisse zu untersuchen.

Tabelle 7: Im Folgenden werden die Analyse aller Kontrollen und die entsprechend folgerichtigen Entscheidungen beschrieben, die basierend auf den Ergebnissen zu treffen sind.

Art der Kontrolle	Erwartetes Ergebnis	Aberrantes Ergebnis
No Template Control	Keine Amplifikation vorhanden: mit der Analyse fortfahren	Amplifikation vorhanden, Assay wiederholen.
Polyklonale Kontrolle	Die Produktgröße entspricht den Erwartungswerten, die in Abschnitt 10.1 <i>Erwartete Größe amplifizierter Produkte</i> aufgeführt werden. Keine klonalen Umlagerungen vorhanden. Mit der Analyse fortfahren.	Klonale Umlagerungen vorhanden. Assay wiederholen
Positivkontrolle (Dies kann auch eine Extraktionskontrolle sein, wenn Positivkontrollmaterial durch Extraktionsprozesse gewonnen wird)	Die Produktgröße entspricht den Erwartungswerten, die in Abschnitt 10.1 <i>Erwartete Größe amplifizierter Produkte</i> aufgeführt werden. Mit der Analyse fortfahren.	Produkt liegt nicht im erwarteten Größenbereich. Assay wiederholen.
Specimen Control Size Ladder (Probenkontroll-Größenleiter) (Diese Amplifikationskontrolle ist für Proben unbekannter Menge und Qualität unverzichtbar.)	Wenn die Peaks bei 96, 197, 297, 397 und 602 bp zu sehen sind, mit der Analyse fortfahren. Da kleinere PCR-Fragmente bevorzugt amplifiziert werden, ist es nicht ungewöhnlich, dass das 602-bp-Fragment ein weniger starkes Signal aufweist oder ganz fehlt. Mit der Analyse fortfahren.	Sind keine Banden sichtbar, den Assay wiederholen, <u>soweit die Probe nicht positiv ist</u> . Sind nur 1, 2 oder 3 Banden sichtbar, prüfen Sie die Probe auf DNA-Abbau, <u>soweit die Probe nicht positiv ist</u> .

8.2. Probeninterpretation

Wenn die Kontrollen die erwarteten Ergebnisse liefern, sind die klinischen Proben folgendermaßen zu bewerten:

- 8.2.1. Ein oder zwei signifikante positive Peaks^a innerhalb des gültigen Größenbereichs sind wie folgt anzugeben:
- „Positiv auf Nachweis von klonalen Genumlagerungen der Beta-Kette des T-Zell-Rezeptors in Übereinstimmung mit dem Vorhandensein einer klonalen Zellpopulation. Im Zusammenhang mit allgemeinen diagnostischen Kriterien können klonale Zellpopulationen auf das Vorhandensein einer hämatologischen Malignität hinweisen.“
- 8.2.2. Die Abwesenheit positiver Peaks^a innerhalb des gültigen Größenbereichs ist wie folgt anzugeben:
- „Negativ auf Nachweis von klonalen Genumlagerungen der Beta-Kette des T-Zell-Rezeptors.“

^aHinweis: Die Kriterien zur Definition positiver Peaks sind wie folgt:

- Produkte aus **diagnostischen Proben**, die innerhalb des gültigen Größenbereichs liegen und deren Amplitude mindestens um einen Faktor drei größer ist als der drittgrößte Peak des polyklonalen Hintergrunds, sind positive Peaks.
- Produkte aus **Proben, die nach der initialen Diagnose entnommen wurden und** innerhalb des gültigen Probenbereichs liegen und entweder; 1) mindestens das Dreifache der Amplitude des drittgrößten Peaks betragen; oder 2) die Amplitude der benachbarten Peaks überschreiten und deren Größe den klonalen Amplikonprodukten entspricht, die zuvor vom selben Patienten mit dem selben Master-Mix generiert wurden, entsprechen einem positiven Peak.

9. Verfahrenseinschränkungen

- Mit diesem Assay können nicht 100 % der klonalen Zellpopulationen identifiziert werden.
- Dieser Assay kann weniger als eine (1) positive Zelle pro 100 normaler Zellen nicht zuverlässig nachweisen.
- Die Ergebnisse molekularer Klonalitätstests müssen immer unter Berücksichtigung klinischer, histologischer und immunphänotypischer Daten interpretiert werden.
- PCR-basierte Assays werden vom Abbau der DNA oder der Hemmung einer PCR-Amplifikation durch EDTA, Heparin und andere Wirkstoffe beeinflusst.

10. Erwartungswerte

10.1. Erwartete Länge der amplifizierten Produkte

Die aufgeführten Amplikon-Größen wurden mithilfe einer ABI-Plattform bestimmt. Die mit dem vorhandenen Kapillarelektrophorese-Gerät gemessenen Amplikon-Größen können sich je nach Detektionsplattform und Version der verwendeten Analyse-Software um 1 bis 4 bp von den aufgelisteten Größen unterscheiden. Nach der initialen Identifikation stimmt die Amplikongröße bei jedem Lauf auf jeder spezifischen Plattform überein. Diese Reproduzierbarkeit ist bei der Überwachung des Wiederauftretens von Krankheiten von großen Nutzen.

Hinweis: „Farbe“ gibt die Farbe der mit dem Master-Mix generierten Produkte an, wenn auf ABI- Fluoreszenzdetektionssystemen die Standard-Farbzueisung verwendet wird.

Tabelle 8: Erwartete Größe amplifizierter Produkte

Master-Mix	Ziel	Farbe	Kontroll-DNA	Katalog-nummer	Produktgröße (bp)
<i>TCRB</i> Tube A	Vβ + Jβ1/2	Blau (Jβ2.X) & Grün (Jβ1.X)	gültiger Längenbereich	---	240 - 285
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	240 - 285, 271 ^a
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	264
			IVS-0004 Clonal Control DNA	40880190	295
<i>TCRB</i> Tube B	Vδ + Jδ + DδVβ + Jβ2	Blau (Jβ2.X)	gültiger Längenbereich	---	240 - 285
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	240 - 285, 221 ^b
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	---
			IVS-0004 Clonal Control DNA	40880190	253
			IVS-0021 Clonal Control DNA	40881210	267

Tabelle 8: Erwartete Größe amplifizierter Produkte

Master-Mix	Ziel	Farbe	Kontroll-DNA	Katalog-nummer	Produktgröße (bp)
TCRBTube C	D β + J β 1/2	Blau (Jβ2.X) & Grün (Jβ1.X)	gültiger Längenbereich	---	170 - 210 (Dβ2), 285 - 325 (Dβ1)
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	128 ^b , 170-210, 285-325, 337 ^b
			IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	309
			IVS-0004 Clonal Control DNA	40880190	295
Specimen Control Size Ladder	mehrere Gene	Blau	gültiger Längenbereich IVS-0000 Polyclonal Control DNA	---	96, 197, 297, 397 602^c 96, 197, 297, 397, 602 ^c

^aHinweis: Die 271-bp-Bande ist besonders in Proben mit einer geringen Anzahl kontaminierender lymphoider Zellen zu sehen.

^bHinweis: Unter suboptimalen Bedingungen können spezifische Produkte von 221 bp (in Röhrchen B) und 128 und 337 bp (in Röhrchen C) nachgewiesen werden. Falls vorhanden, sind diese Banden normalerweise schwach.

^cHinweis: Da kleinere PCR-Fragmente bevorzugt amplifiziert werden, ist es nicht ungewöhnlich, dass das 602-bp-Fragment ein weniger starkes Signal aufweist oder ganz fehlt. Bei der ABI-Fluoreszenzdetektion wird der 602-bp-Peak bei normalen Durchgangszeiten möglicherweise nicht angezeigt. Darüber hinaus kann die Größe dieses Peaks um über 30 bp abweichen, wenn die Fragmentgröße mit GeneScan - 400HD [ROX]-Größenstandards extrapoliert wird.

10.2. Beispieldaten

Die in den Abbildungen 2 - 4 gezeigten Daten wurden mit dem angegebenen Mastermix generiert. Amplifizierte Produkte wurden auf einem ABI-Instrument laufen gelassen.

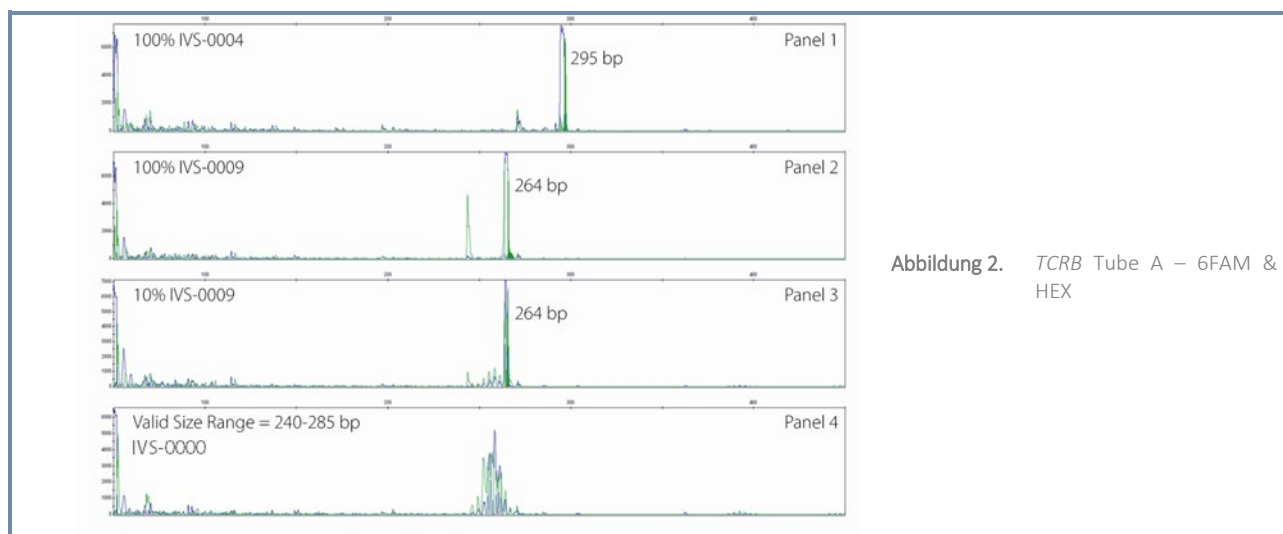


Abbildung 2. TCRB Tube A – 6FAM & HEX

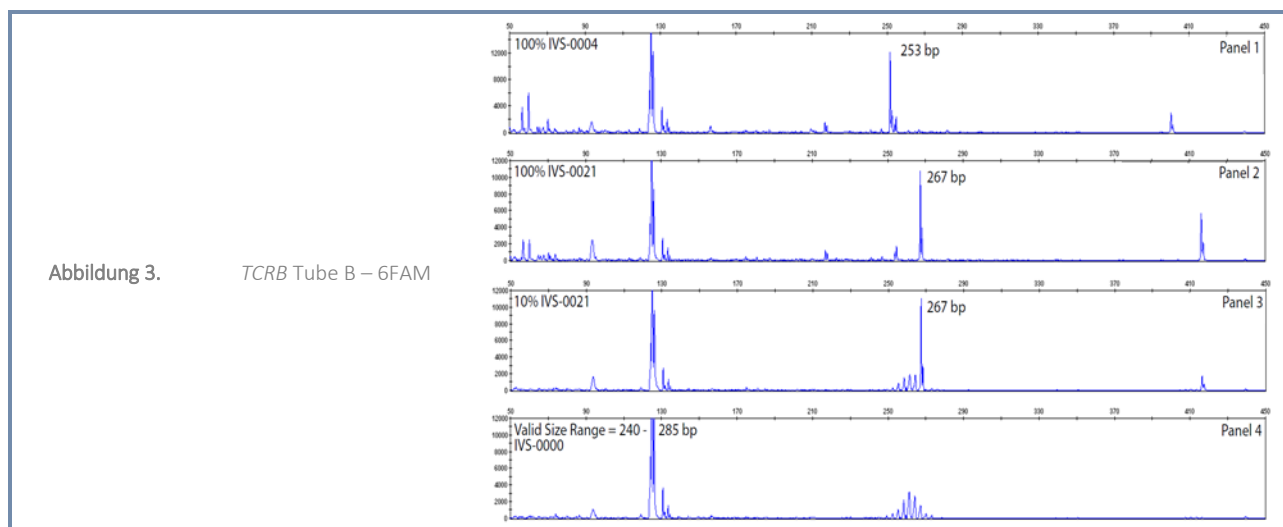


Abbildung 3. TCRB Tube B – 6FAM

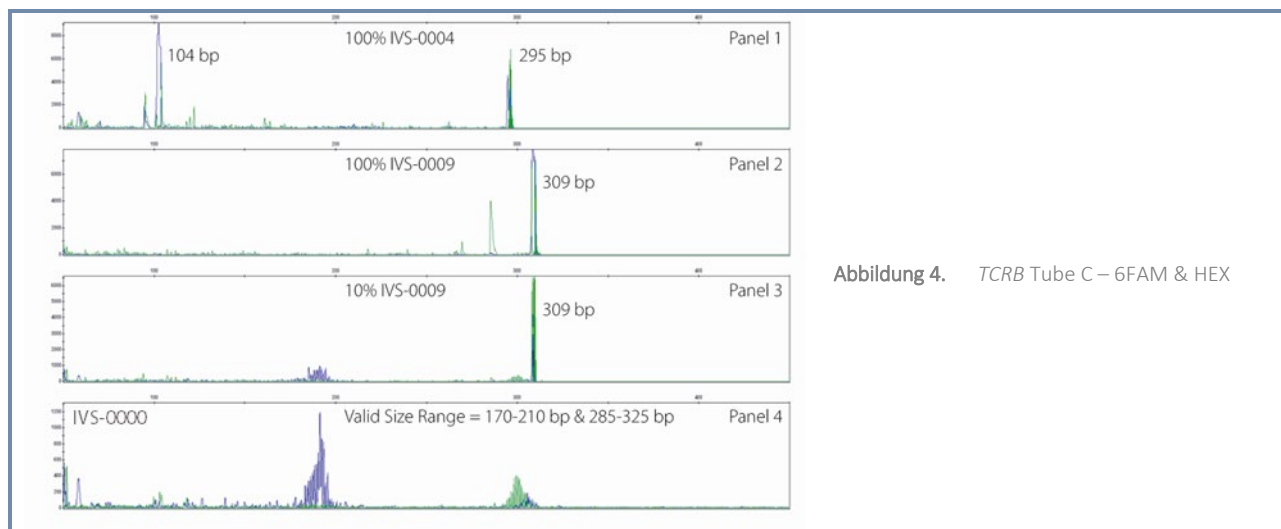


Abbildung 4. TCRB Tube C – 6FAM & HEX

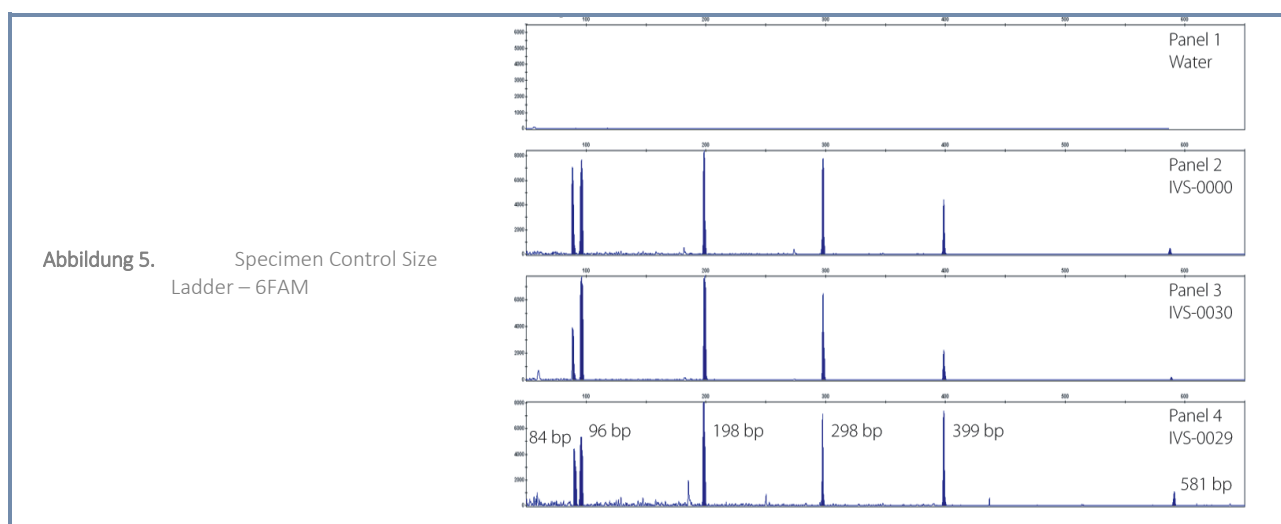


Abbildung 5. Specimen Control Size Ladder – 6FAM

11. Leistungseigenschaften

Dieser IdentiClone *TCRB* Gene Clonality PCR-Test ist ein schnelles und zuverlässiges Verfahren für den Nachweis von Klonalität bei Verdacht auf Lymphproliferation, das wesentlich empfindlicher ist als das Southern-Blot-Verfahren (SB). Die abschließende klinisch-histopathologische Diagnose stimmt im Vergleich mit SB-Ergebnissen bei einer größeren Zahl an Patienten gut mit den PCR-Ergebnissen überein. Dies wird durch zwei bemerkenswerte Arbeiten belegt, von denen eine 2003 in *Leukemia* von van Dongen et al. und eine 2005 im *Journal of Molecular Diagnostics* (JMD) von Sandberg et al.

Tabelle 9. Konkordanzstudien

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

Tabelle 10. PCR- im Vergleich zu SB-Analyse relativ zur Histopathologie und der abschließenden Diagnose

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

Die Studie von Sandberg *et al.* war eine unabhängige Studie mit 300 Patientenproben aus einer Vielzahl von Probenarten. In Fällen, in denen sowohl PCR- als auch SB-Analysen durchgeführt wurden und die Ergebnisse mit der Histopathologie und einer endgültigen Diagnose korreliert werden konnten, wurde die diagnostische Genauigkeit ausgewählter IdentiClone-Tests mit mindestens 96 % bestimmt. Dies war weitaus genauer als die SB-Analyse, die in dieser Studie 23 klare Fälle von Malignität und 7 wahrscheinliche Malignitäten übersah. Mit den IdentiClone-Tests wurden keine eindeutigen falsch positiven Ergebnisse generiert, und es gab ein hohes Maß an Präzision.³ Darüber hinaus bestand ein klarer Vorteil dieses Assays darin, dass die generierten klonalen Ergebnisse die anschließende Erkennung von patienten- und tumorspezifischen Genumlagerungen für ermöglichten minimale Erkennung von Resterkrankungen.

12. Technischer Support und Kundendienst

Vertreter des technischen und Kundendienstes stehen montags bis freitags zur Verfügung, um Anfragen per Telefon, E-Mail oder über die Webseite zu beantworten.

Kontaktdaten



Invivoscribe, Inc

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

Telefon: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Geschäftszeiten: 7:00 Uhr bis 17:00 Uhr PST/PDT

Technischer Kundendienst: support@invivoscribe.com | Kundenbetreuung: sales@invivoscribe.com | Webseite: www.invivoscribe.com

13. Bibliographie

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

14. Symbole

Die folgenden Symbole werden für die Beschriftung von Invivoscribe-Diagnoseprodukten verwendet.

	Katalognummer		Verfallsdatum
	Reagenzvolumen		Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft
	Chargennummer		Gebrauchsanweisung Beachten
	Lagerbedingungen		In-vitro-Diagnostikum
	Eindeutige Gerätekennung		Hersteller
	UK-Konformität Geprüft		Verantwortliche Person im Vereinigten Königreich
	Bevollmächtigter Schweizer Vertreter		Europäische Konformität

15. Haftungshinweis

15.1. Garantie und Haftung

Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) möchte Produkte von höchster Qualität anbieten. Invivoscribe® garantiert, dass die Produkte die in der Gebrauchsanweisung beschriebenen Leistungsstandards für Produkte mit entsprechendem Verwendungszweck erfüllen oder übertreffen. Wenn für ein Produkt Produktspezifikationen gelten und das Produkt die angegebenen Leistung nicht erbringt, ersetzen wir das Produkt oder schreiben den vollen Kaufpreis gut. Invivoscribe® gewährt keine sonstigen Garantien, weder ausdrücklicher noch stillschweigender Art. Die Haftung von Invivoscribe® überschreitet nicht den Kaufpreis des Produkts. Invivoscribe haftet nicht für direkte, indirekte, Folgeschäden oder Nebenschäden, die sich aus der Verwendung, den Ergebnissen der Verwendung oder der Unfähigkeit der Verwendung der Produkte des Unternehmens ergeben. Die Effizienz des Produkts unter vom Käufer kontrollierten Bedingungen im Labor des Käufers muss durch vom Käufer definierte und kontrollierte Prozesse ermittelt und kontinuierlich überwacht werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf das Testen von Positiv-, Negativ- und Blindkontrollen bei jedem Test einer Probe. Mit der Bestellung, Annahme und Verwendung des Produkts übernimmt der Käufer die alleinige Verantwortung für die Gewährleistung der Effizienz des Produkts und erklärt die Zustimmung zu der Haftungsbeschränkung gemäß diesem Absatz.

Dieses Produkt ist ein Produkt für die *In-vitro*-Diagnostik, das in Nordamerika nicht zum Verkauf oder zur Verwendung angeboten wird.

15.2. Patente und Marken

Dieses Produkt ist durch eines oder mehrere der folgenden Produkte geschützt: Europäisches Patent Nr. 1549764, Europäisches Patent Nr. 2418287, Europäisches Patent Nr. 2460889, Japanisches Patent Nr. 4708029, US-Patent 8859748 und verwandte anhängige und zukünftige Anmeldungen. Alle diese Patente und Anwendungen sind ausschließlich an Invivoscribe® lizenziert. Weitere an Invivoscribe lizenzierte Patente, die einige dieser Produkte abdecken, gelten in anderen Bereichen. Viele dieser Produkte erfordern Methoden zur Nukleinsäureamplifikation, wie eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Keine Lizenz unter diesen Patenten, Amplifikationsverfahren oder -enzyme einzusetzen, wird durch den Erwerb dieses Produkt ausdrücklich oder impliziert an den Käufer übertragen.

Identiclone® ist eine eingetragene Handelsmarke von Invivoscribe®.

©2023 Invivoscribe, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Die in diesem Dokument genannten Handelsmarken sind Eigentum von Invivoscribe, Inc. und/oder deren Tochterunternehmen oder (falls Handelsmarken Dritter genannt werden) der entsprechenden Eigentümer.