

Gebrauchsanleitung



## IdentiClone® *IGH* Gene Clonality Assay

Zur Identifizierung von klonalen Umlagerungen des Gens für die Immunglobulin-Schwerkette.

**IVD** *In-vitro*-Diagnostikum



 Lagerbedingungen: -85°C to -65°C

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

Katalognummer	Produkte	Menge
<b>REF</b> 91010061	IdentiClone <i>IGH</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Reaktionen
<b>REF</b> 91010081	IdentiClone <i>IGH</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Reaktionen

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>BESTIMMUNGSGEMÄÙE VERWENDUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES ASSAYS .....</b>	<b>3</b>
2.1.	Hintergrund.....	3
2.2.	Zusammenfassung.....	3
<b>3.</b>	<b>VERFAHRENSPRINZIP .....</b>	<b>4</b>
3.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	4
3.2.	Nachweis mittels differentieller Fluoreszenz .....	5
<b>4.</b>	<b>REAGENZIEN .....</b>	<b>5</b>
4.1.	Bestandteile der Reagenzien.....	5
4.2.	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen .....	6
4.3.	Lagerung und Handhabung .....	7
<b>5.</b>	<b>INSTRUMENTE.....</b>	<b>7</b>
5.1.	Thermocycler .....	7
5.2.	ABI-Kapillarelektrophorese-Instrumente.....	7
<b>6.</b>	<b>PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG.....</b>	<b>8</b>
6.1.	Vorsichtsmaßnahmen.....	8
6.2.	Interferierende Substanzen.....	8
6.3.	Anforderungen an die Proben und deren Handhabung.....	8
6.4.	Vorbereitung der Proben .....	8
6.5.	Lagerung der Proben .....	8
<b>7.</b>	<b>ASSAY-VERFAHREN.....</b>	<b>9</b>
7.1.	Im Lieferumfang enthaltene Materialien.....	9
7.2.	Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien .....	9
7.3.	Vorbereitung der Reagenzien .....	10
7.4.	Amplifikation.....	11
7.5.	ABI Fluoreszenzdetektion.....	11
7.6.	Qualitätskontrolle .....	12
7.7.	Empfohlene Positivkontrollen .....	13
<b>8.</b>	<b>AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE.....</b>	<b>13</b>
8.1.	Analyse.....	13
8.2.	Interpretation der Proben.....	14
<b>9.</b>	<b>ANWENDUNGSGRENZEN DES VERFAHRENS.....</b>	<b>14</b>
<b>10.</b>	<b>ERWARTUNGSWERTE .....</b>	<b>15</b>
10.1.	Erwartete GröÙe amplifizierter Produkte.....	15
10.2.	Probendaten .....	16
<b>11.</b>	<b>LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN.....</b>	<b>18</b>
<b>12.</b>	<b>REFERENZEN .....</b>	<b>18</b>
<b>13.</b>	<b>TECHNISCHER KUNDENDIENST .....</b>	<b>18</b>
<b>14.</b>	<b>SYMBOLE.....</b>	<b>19</b>
<b>15.</b>	<b>RECHTLICHE HINWEISE.....</b>	<b>19</b>
15.1.	Gewährleistung und Haftung.....	19
15.2.	Patente und Marken .....	19

## 1. Bestimmungsgemäße Verwendung

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

- Erkennung von Klonalität bei atypischen lymphoproliferativen Erkrankungen
- Unterstützung einer Differentialdiagnose zwischen reaktiven Läsionen und hämatologischen Malignitäten<sup>4</sup>
- Zuweisung einer vermutlichen Abstammungslinie bei reifen monoklonalen lymphoproliferativen Erkrankungen
- Identifizierung tumorspezifischer Marker (*IGH*-Genumlagerungen) für die Nachbehandlungsüberwachung
- Überwachung und Beurteilung von Krankheitsrückfällen

## 2. Zusammenfassung und Erläuterung des Assays

### 2.1. Hintergrund

Umlagerungen der Antigenrezeptor-Gene treten während der Ontogenese bei B- und T-Lymphozyten auf. Durch diese Genumlagerungen entstehen in ihrer Länge und Sequenz für jede Zelle einzigartige Produkte. 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.<sup>1</sup> Dieser PCR-Assay verwendet mehrere Konsensus-DNA-Primer, die an die konservierten Genregionen im Immunglobulin-Schwerketten-Gen binden. Dieser Test wird für den Nachweis der überwiegenden Mehrheit klonaler B-Zell-Malignitäten aus der DNA verwendet. Die Assayprodukte können mithilfe einer Reihe von Detektionsmethoden, einschließlich Gel- und Kapillarelektrophorese, analysiert werden.

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.<sup>2</sup>

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

### 2.2. Zusammenfassung

Das Assaykit umfasst sechs (6) Master-Mixe. Die *IGH* Tube A, B und C Master-Mixe (*IGH*-Röhrchen mit Master-Mix A, B und C) zielen auf die Framework-Regionen 1, 2 bzw. 3 in der variablen Region und der J-Region des Genlocus der Immunglobulin-Schwerkette ab. Die *IGH* Tube D und E Master-Mixe (*IGH*-Röhrchen mit Master-Mix D und E) zielen auf die D- bzw. J-Regionen ab. Der Master-Mix der Specimen Control Size Ladder (Probenkontroll-Größenleiter) amplifiziert mehrere Gene und erzeugt eine Reihe von Amplikons von ca. 96, 197, 297, 397 und 602 Basenpaaren (bp), um sicherzustellen, dass Qualität und Quantität der eingesetzten DNA für den Erhalt eines gültigen Ergebnisses ausreichen. Bei allen Assays von Invivoscribe zur Genklonalität werden ein einziges Thermocycler-Programm und ähnliche Detektionsmethoden verwendet. Dies verbessert die Vergleichbarkeit und ermöglicht die Schulung an einem breiten Spektrum der verschiedenen Assays.

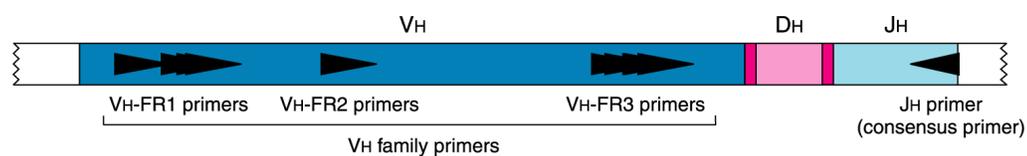
Dieser Assay basiert auf der Euroclonality/BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.



### 3. Verfahrensprinzip

#### 3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Assays werden routinemäßig zur Identifizierung klonaler B-Zell-Populationen verwendet. Diese Assays amplifizieren die DNA zwischen Primern, die das konservierte Gerüst (Framework, FR) der variablen Regionen (V) und die konservierten J-Regionen (joining) (*IGH* Tubes A, B und C (*IGH*-Röhrchen A, B und C)) sowie die D- (diversity) und J-Regionen (*IGH* Tubes D und E (*IGH*-Röhrchen D und E)) zum Ziel haben. Diese konservierten Regionen liegen auf beiden Seiten eines Bereichs auf der V-J-Region, in der es während der Entwicklung sämtlicher B- und T-Lymphozyten zu programmierten Gen-Umlagerungen kommt. Bei den eine Umlagerung durchlaufenden Antigenrezeptor-Genen handelt es sich um die leichten und schweren Immunglobulinketten in B-Zellen und die T-Zell- Rezeptorgene in T-Zellen. Jede B- und T-Zelle verfügt über eine einzelne produktive V-J-Umlagerung, die sowohl hinsichtlich ihrer Länge als auch in ihrer Sequenz einzigartig ist. Wenn DNA einer normalen oder polyklonalen Population mithilfe von vor und nach der V-J-Region bindenden DNA-Primern amplifiziert wird, liegen die Amplikonprodukte auf einer Glockenkurve innerhalb des zu erwartenden Größenbereichs. Diese gaußsche Normalverteilung spiegelt die heterogene Population von V-J-Umlagerungen wider. (In bestimmten Fällen ist bei Fehlen von Lymphozyten-DNA kein Produkt sichtbar.) DNA aus Proben mit einer klonalen Population liefert ein oder zwei prominente amplifizierte Produkte (Amplikons) in einem verminderten polyklonalen Hintergrund.



Tube A: 6 VH-FR1 Primers + JH Consensus Primer

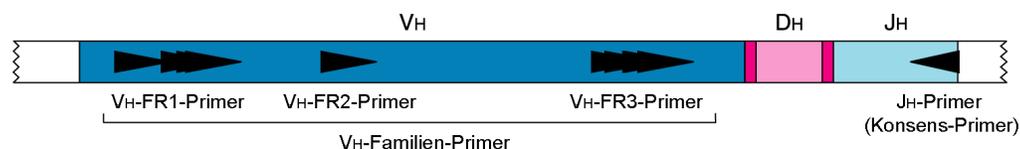
Tube B: 7 VH-FR2 Primers + JH Consensus Primer

Tube C: 7 VH-FR3 Primers + JH Consensus Primer



Tube D: 6 DH Primers + JH Consensus Primer

Tube E: DH7 Primer + JH Consensus Primer



Röhrchen A: 6 VH-FR1-Primer + JH-Konsens-Primer

Röhrchen B: 7 VH-FR2-Primer + JH-Konsens-Primer

Röhrchen C: 7 VH-FR3-Primer + JH-Konsens-Primer



Röhrchen D: 6 DH-Primer+ JH-Konsens-Primer

Röhrchen E: DH7-Primer + JH-Konsens-Primer

Abbildung 1.

Abgebildet ist eine einfache Repräsentation der Organisation des umgelagerten Immunglobulin-Schwerketten- Gens auf Chromosom 14. Schwarze Pfeile zeigen die relativen Positionen der Primer, die das konservierte Gerüst (FR1-3) und die D-Regionen (D<sub>H</sub>1-7) zum Ziel haben, sowie die downstream liegenden Consensus-J<sub>H</sub>-Gensegmente. Die Amplikonprodukte, die aus jeder dieser Regionen erzeugt werden, können unter Verwendung von fluoreszierenden Primersets in Kapillarelektrophoreseinstrumenten mit differentieller Fluoreszenzdetektion voneinander unterschieden werden.

Da die Antigenrezeptor-Gene polymorph sind (d. h. sie bestehen aus einer heterogenen Population verwandter DNA-Sequenzen), ist es schwierig, alle an die V-J-Umlagerung angrenzenden konservierten Regionen mit einem einzigen Satz an DNA-Primer-Sequenzen zu amplifizieren. 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 Amplikonprodukte, die rund um die statistisch bevorzugte und durchschnittlich große Umlagerung eine Gaußsche Normalverteilung bilden, identifiziert. Hier ist zu beachten, dass die Primer, die verschiedene FR-Regionen in drei unterschiedlichen Abschnitten des Schwerketten-Gens amplifizieren, entsprechend verschiedene Größenbereiche an V-J-Produkten erzeugen.

### 3.2. Nachweis mittels differentieller Fluoreszenz

Nachweis mittels differentieller Fluoreszenz wird oft verwendet, um die Amplikonprodukte mit verschiedenen Größen mittels eines Kapillarelektrophorese-Geräts nachzuweisen. Primer können mit mehreren verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorophore) konjugiert werden, sodass diese nach Anregung mit einem Laser im Kapillarelektrophorese-Gerät verschiedene Emissionsspektren erzeugen. So repräsentieren verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verschiedene Zielregionen. Dieses Nachweissystem bietet eine unübertroffene Empfindlichkeit, Auflösung einzelner Nukleotide, Nachweis differentieller Produkte und relative Quantifizierung. Außerdem kann die Verwendung von Agarose- und Polyacrylamidgelen sowie von Karzinogenen wie Ethidiumbromid nahezu vermieden werden. Weiterhin ermöglicht der differentielle Nachweis die genaue, reproduzierbare und objektive Interpretation von Primer-spezifischen Produkten und das automatische Archivieren von Daten. Die Inter- und Intra-Assay-Reproduzierbarkeit der Größenbestimmung liegt bei ca. 1 bis 2 Nukleotiden. Diese Reproduzierbarkeit und Sensitivität in Kombination mit der automatischen Archivierung der Probanddaten ermöglicht eine Überwachung, Verfolgung und den Vergleich von Patientendaten im Zeitverlauf.

## 4. Reagenzien

### 4.1. Bestandteile der Reagenzien

Tabelle 1. Verfügbare Kits

Bestellnr.	Beschreibung	Stückzahl
 91010061	IdentiClone <i>IGH</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Reaktionen
 91010081	IdentiClone <i>IGH</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Reaktionen

Tabelle 2. Kit-Bestandteile

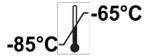
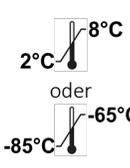
Reagenz	Bestellnr.	Bestandteile der Reagenzien (Wirkstoffe)	Stückzahl	91010061 Stückzahl	91010081 Stückzahl	Lager-temperatur
Master-Mixe	21010011CE	<b><i>IGH</i>Tube A – 6FAM</b> Mehrere Oligonukleotide, die auf die FR-Region 1 des Immunglobulin-Schwerketten-Gens abzielen, in gepufferter Salzlösung.	1.500 µl	1	10	
	21010101CE	<b><i>IGH</i>Tube B – 6FAM</b> Mehrere Oligonukleotide, die auf die FR-Region 2 des Immunglobulin-Schwerketten-Gens abzielen, in gepufferter Salzlösung.	1.500 µl	1	10	
	21010031CE	<b><i>IGH</i>Tube C – HEX</b> Mehrere Oligonukleotide, die auf die FR-Region 3 des Immunglobulin-Schwerketten-Gens abzielen, in gepufferter Salzlösung.	1.500 µl	1	10	
	21010041CE	<b><i>IGH</i>Tube D – HEX</b> Mehrere Oligonukleotide, die auf die D- und J-Regionen des Immunglobulin-Schwerketten-Gens abzielen, in gepufferter Salzlösung.	1.500 µl	1	10	
	21010051CE	<b><i>IGH</i>Tube E – 6FAM</b> Mehrere Oligonukleotide, die auf die D- und J-Regionen des Immunglobulin-Schwerketten-Gens abzielen, in gepufferter Salzlösung.	1.500 µl	1	10	
Master-Mix für die Amplifikationskontrolle	20960021	<b>Specimen Control Size Ladder – 6FAM</b> Mehrere Oligonukleotide, die an Housekeeping-Gene binden.	1.500 µl	1	10	

Tabelle 2. Kit-Bestandteile

Reagenz	Bestellnr.	Bestandteile der Reagenzien (Wirkstoffe)	Stückzahl	91010061 Stückzahl	91010081 Stückzahl	Lager- temperatur
DNAs für die Positivkontrolle	40881750	<b>IVS-0030 Clonal Control DNA</b> 200 µg/ml DNA in 1/10-TE-Lösung	100 µl	1	5	
	40881090	<b>IVS-0019 Clonal Control DNA</b> 200 µg/ml DNA in 1/10-TE-Lösung	100 µl	1	5	
	40881390	<b>IVS-0024 Clonal Control DNA</b> 200 µg/ml DNA in 1/10-TE-Lösung	100 µl	1	5	
	40880430	<b>IVS-0008 Clonal Control DNA</b> 200 µg/ml DNA in 1/10-TE-Lösung	100 µl	1	5	
<b>Negative (normale) Kontroll-DNA</b>	40920010	<b>IVS-0000 Polyclonal Control DNA</b> 200 µg/ml DNA in 1/10-TE-Lösung	100 µl	1	5	

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

#### 4.2. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- **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 bei korrekter Lagerung und Handhabung bis zum auf dem Etikett angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die Kits sollten nicht nach dem Verfallsdatum verwendet werden.
- Um eine optimale Leistung und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, muss das Protokoll genauestens eingehalten 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 dürfen nicht gemischt oder kombiniert werden.
- 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. Die Proben sind in entsprechend zugelassenen Einrichtungen mit biologischer Schutzstufe zu handhaben und ausschließlich in zertifizierten biologischen Sicherheitswerkbänken zu öffnen. Für die Aufarbeitung 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. von Negativ-Kontrollen ausgehende positive Signale). Reagenzien, die vermutlich kontaminiert sind, müssen entsorgt werden.
- Um die Gefahr einer Kontamination zu minimieren, sollten bei der Handhabung von Proben und Reagenzien Handschuhe getragen und die Arbeitsbereiche und Pipetten vor der PCR regelmäßig gereinigt werden.
- Das Autoklavieren kann eine Kontamination mit DNA nicht verhindern. Der Arbeitsablauf im PCR-Labor sollte stets unidirektional ablaufen: Zunächst Vorbereitung des Master-Mix, anschließend Probenaufreinigung, dann Amplifikation und abschließend Detektion. Amplifizierte DNA sollte nicht in den Bereich gebracht werden, der für die Zubereitung des Master-Mix oder der 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 gründlich gevortext und gemischt werden, um sicherzustellen, dass sie vollständig resuspendiert wurden. Übermäßiges Vortexen kann die DNA zertrennen und dazu führen, dass Primer ihre Fluorophore verlieren.
- Die Materialien sind bei korrekter Lagerung und Handhabung bis zum auf dem Etikett angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die Kits sollten nicht nach dem Verfallsdatum verwendet werden.
- Aufgrund ihrer hohen Salzkonzentrationen sind PCR-Master-Mixe empfindlich gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen. Die Master-Mixe in sterile Röhren mit Schraubverschluss mit O-Ring aliquotieren, falls relevant.

## 5. Instrumente

### 5.1. Thermocycler

- Verwendung oder Funktion: Amplifikation von DNA-Proben
- Empfohlenes Instrument: Veriti™ Dx Thermal Cycler oder ein vergleichbares Gerät
- Leistungseigenschaften und Spezifikation:
  - Temperaturmindestanforderungen: 15°C bis 96°C
  - Mindestgeschwindigkeit der Temperaturerhöhung: 0,8°C/s.
- Den Installations-, Betriebs-, Kalibrierungs- und Wartungsanweisungen des Herstellers ist Folge zu leisten.
- Angaben zum Thermocyclerprogramm finden Sie in Abschnitt 7.4 *Amplifikation*.

### 5.2. ABI-Kapillarelektrophorese-Instrumente

- Verwendung oder Funktion: Detektion und Analyse von Fragmenten
- Leistungseigenschaften und Spezifikation:
  - Die folgenden Kapillarelektrophorese-Instrumente erfüllen die Leistungsanforderungen dieses Assays:
    - ABI 310 Genetic Analyzer (1-capillary) (Genanalysator (1 Kapillare))
    - ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (4-capillaries) (Avant-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))
- Den Installations-, Betriebs-, Kalibrierungs- und Wartungsanweisungen des Herstellers ist Folge zu leisten.
- Das verwendete ABI-Instrument muss mit den geeigneten Matrix Standards gemäß Beschreibung in Abschnitt 7.2: *Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien* kalibriert werden.
- Verwenden Sie die Standardeinstellungen für Ihr Polymer und Ihren Kapillartyp.
- Eine Anleitung zur Probenpräparation finden Sie in Abschnitt 7.5: *ABI Fluoreszenzdetektion*.

## 6. Probenentnahme und -vorbereitung

### 6.1. Vorsichtsmaßnahmen

Humanproben können potenziell infektiöses Material enthalten. Sämtliche Proben sind gemäß der OSHA-Richtlinie zu über den Blutweg übertragenen Krankheitserregern bzw. Biologischer Schutzstufe 2 zu handhaben.

### 6.2. Interferierende Substanzen

Die folgenden Substanzen stören die PCR nachweislich:

- Divalente Kationen (Chelatbildner)
- Low-Retention-Pipettenspitzen
- EDTA (in geringen Konzentrationen zu vernachlässigen)
- Heparin

### 6.3. Anforderungen an die Proben und deren Handhabung

Dieser Assay testet **genomische DNA** aus folgenden Quellen:

- 5 ml peripheres Blut, Knochenmarkbiopsien oder Knochenmarkaspirat mit Heparin oder EDTA als Antikoagulans (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)
- 3 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. Vorbereitung der Proben

Die genomische DNA schnellstmöglich aus den Patientenproben extrahieren. Die DNA auf eine Endkonzentration von 100 µg bis 400 µg pro ml in 1/10 TE-Puffer (1 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 mM EDTA) oder in für die Molekularbiologie geeignetem oder hochreinem Wasser resuspendieren. Dieses Assay-System ist robust, sodass mit einem breiten Spektrum an DNA-Konzentrationen ein gültiges Ergebnis erzielt werden kann. Daher ist eine Quantifizierung und Anpassung der DNA-Konzentrationen im Allgemeinen nicht notwendig. Durch eine Überprüfung der aus der Patientenprobe isolierten DNA mit dem Master-Mix der Specimen Control Size Ladder (Probenkontroll-Größenleiter) wird sichergestellt, dass die DNA in ausreichender Qualität und Quantität vorhanden ist, um ein gültiges Ergebnis zu erhalten.

### 6.5. Lagerung der Proben

Genomische DNA bis zum Gebrauch bei 2°C bis 8°C oder -85°C bis -65°C lagern.

## 7. Assay-Verfahren

### 7.1. Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Tabelle 3. Kit-Bestandteile

Bestellnr.	Beschreibung
21010011CE	IGH Tube A – 6FAM
21010101CE	IGH Tube B – 6FAM
21010031CE	IGH Tube C – HEX
21010041CE	IGH Tube D – HEX
21010051CE	IGH Tube E – 6FAM
20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM
40881750	IVS-0030 Clonal Control DNA
40881090	IVS-0019 Clonal Control DNA
40881390	IVS-0024 Clonal Control DNA
40880430	IVS-0008 Clonal Control DNA
40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA

### 7.2. Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Tabelle 4. Erforderliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)

Reagenz/Material	Empfohlene Reagenzien/Materialien und Anbieter	Bestellnr.	Anmerkungen
DNA-Polymerase	Roche: <ul style="list-style-type: none"> <li>EagleTaq DNA Polymerase</li> </ul> Invivoscribe, Inc.: <ul style="list-style-type: none"> <li>FalconTaq DNA Polymerase</li> </ul> oder gleichwertige Polymerase	05206944190 60970130	k. A.
Glasdestilliertes, deionisiertes und für die Molekularbiologie geeignetes Wasser oder hochreines Wasser	k. A.	k. A.	Steril und frei von DNase und RNase.
Kalibrierte Pipetten	Rainin: <ul style="list-style-type: none"> <li>P-2-, P-20-, P-200- und P-1000-Pipetten</li> <li>Oder SL-2-, SL-20-, SL-200- und SL-1000-Pipetten</li> </ul>	k. A.	Müssen für die genaue Messung von Volumina zwischen 1 µl und 1000 µl geeignet sein.
Thermocycler	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>Veriti Dx Thermal Cycler</li> </ul> Bio-Rad: <ul style="list-style-type: none"> <li>MJ Research PTC-100 oder PTC-200, PTC-220, PTC-240</li> </ul> Perkin-Elmer <ul style="list-style-type: none"> <li>PE 9600 oder PE 9700</li> </ul>	k. A.	k. A.
Vortexer	k. A.	k. A.	k. A.
PCR-Platten oder -Gefäße	k. A.	k. A.	Steril
Pipettenspitzen mit Filterbarriere	k. A.	k. A.	Steril, RNase-/DNase-/pyrogenfrei
Mikrozentrifugengefäße	k. A.	k. A.	Steril
ABI-Kapillarelektrophorese-Instrument	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>ABI 310-, 3100- oder 3500-Serie</li> </ul>	k. A.	k. A.
Hochdeionisiertes Formamid	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hi-Di™ Formamide</li> </ul>	4311320	k. A.
Größenstandards	Invivoscribe: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hi-Di Formamide mit ROX-Größenstandards für ABI 3100</li> </ul> Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Für Instrumente der Serie ABI 3100 oder 3130: <ul style="list-style-type: none"> <li>GeneScan™ - 400HD [ROX]™</li> </ul> </li> <li>Für Instrumente der Serie ABI 3500: <ul style="list-style-type: none"> <li>GeneScan - 600 [LIZ]™ v2.0</li> </ul> </li> </ul>	60980061 402985 4408399	k. A.

Tabelle 4. Erforderliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)

Reagenz/Material	Empfohlene Reagenzien/Materialien und Anbieter	Bestellnr.	Anmerkungen
Färbesets zur Spektralkalibrierung	Applied Biosystems:		
	• Für Instrumente der Serie ABI 3100 und 3130:		
	○ DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D)	4345827	
	• Für Instrumente der Serie ABI 310:		
○ NED Matrix Standard	402996	k. A.	
○ und Fluorescent Amidite Matrix Standards [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX]	401546		
• Für Instrumente der Serie ABI 3500:			
○ DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5)	4345833		
Polymer	Applied Biosystems:		
	• POP-4™-Polymer:		
	○ POP-4 für 310 Genetic Analyzers	402838	
	○ POP-4 für 3100/3100-Avant Genetic Analyzers	4316355	
	○ POP-4 für 3130/3130xL Genetic Analyzers	4352755	k. A.
	• POP-7™-Polymer:		
○ POP-7 für 3130/3130xL Genetic Analyzers	4352759		
○ POP-7 für 3500/3500xL Genetic Analyzers	4393714		
Puffer	Applied Biosystems:		
	• 10X Genetic Analyzer Buffer with EDTA	402824	Vor dem Gebrauch mit sterilem Wasser auf 1:10 verdünnen.

### 7.3. Vorbereitung der Reagenzien

- Alle unbekanntes Proben können mit dem Specimen Control Size Ladder Master Mix (Größenleiter-Master-Mix für Probenkontrollen) getestet werden. Dadurch wird sichergestellt, dass keine Amplifikationsinhibitoren vorhanden sind und Qualität und Quantität der DNA für ein gültiges Ergebnis ausreichen.
- Ergebnisse bei einfacher Assayausführung sind gültig, allerdings sind Assays in **Duplikaten** empfehlenswert, soweit möglich. Liefert die Untersuchung einer Probe im Duplikat inkonsistente Ergebnisse, ist eine erneute Untersuchung oder Bewertung der Probe erforderlich.
- **Positiv-, Negativ- und Nicht-Template-Kontrollen** sollten für jeden Master-Mix durchgeführt werden.
- Mehrere Proben sollten in einem Durchlauf gemessen werden, um zu verhindern, dass die Negativ-Kontrolle (IVS-0000 Polyclonal Control DNA) zu schnell verbraucht wird. Sollte das Zusammenlegen von Proben in Ihrem Labor nicht praktikabel sein, kann IVS-0000 Polyclonal Control DNA auch separat erworben werden.

7.3.1. Die Master-Mixe mit behandschuhten Händen aus dem Gefrierschrank nehmen. Die Gefäße vollständig auftauen lassen und dann vorsichtig vortexen, um den Inhalt zu vermischen.

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

- Das Volumen der Aliquote beträgt für jede Reaktion 45 µl.
- Für jeweils 15 Reaktionen eine zusätzliche Reaktion ansetzen, um Pipettierfehler auszugleichen.
- Die Anzahl der Reaktionen (**n**) für jeden Master-Mix (mit Ausnahme der Specimen Control Size Ladder) beträgt daher:

<b>n = 2 × Anzahl an Proben</b>	(Jede Probe im Duplikat durchführen)
+ 1	Positiv-Kontroll-DNA (Siehe Abschnitt 7.7 : <i>Empfohlene Positivkontrollen</i> )
+ 1	Negativ-Kontroll-DNA (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	Nicht-Template-Kontrolle (Wasser)
+ 1	zum Ausgleich von Pipettierfehlern
<hr/>	
<b>n = 2 × Anzahl an Proben + 4</b>	<b>Insgesamt</b>

- Daher sollte das Aliquot-Gesamtvolumen für jeden Master-Mix = **n × 45 µl** betragen.
- Der Specimen Control Size Ladder Master-Mix hat die folgende Anzahl an Reaktionen (**m**):

<b>m = Anzahl an Proben</b>	(Jede Probe im Duplikat durchführen)
+ 1	Positiv-Kontroll-DNA (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	Nicht-Template-Kontrolle (Wasser)
+ 1	zum Ausgleich von Pipettierfehlern
<hr/>	
<b>m = Anzahl an Proben + 3</b>	<b>Insgesamt</b>

- Das Gesamt-Aliquotvolumen für den Master-Mix der Specimen Control Size Ladder = **m × 45 µl**.

- 7.3.3. 1,25 U (oder 0,25 µl zu 5 U/µl) Taq-DNA-Polymerase pro Reaktion zu jedem Master-Mix hinzugeben.
- Das Gesamtvolumen der zum Master-Mix der Specimen Control Size Ladder hinzugegebenen Taq-DNA-Polymerase beträgt  $n \times 0,25 \mu\text{l}$  und  $m \times 0,25 \mu\text{l}$  für den Master-Mix der Specimen Control Size Ladder.
  - Zum Vermischen behutsam vortexen.
- 7.3.4. Für jede Reaktion 45 µl des relevanten Master-Mix + DNA-Polymerase in individuelle Wells einer PCR-Platte oder PCR-Röhrchen überführen.
- 7.3.5. 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 Vermischen mehrmals auf- und abpipettieren.
- 7.3.6. Die PCR-Platte verschließen oder abdecken.
- Die Proben sind nun bereit für die Amplifikation im Thermocycler.
  - 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:**Für jeden Master-Mix und n Reaktionen Folgendes vermischen: $n \times 45 \mu\text{l}$  Master-Mix $n \times 0,25 \mu\text{l}$  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.Gesamtreaktionsvolumen = **50 µl**

## 7.4. Amplifikation

- 7.4.1. 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. Amplifikationsplatte 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 stattfinden.

## 7.5. ABI Fluoreszenzdetektion

- Bitte beachten Sie, dass bei der ABI-Fluoreszenzdetektion häufig ein vorangehender Peak angezeigt wird, bei dem es sich um ein bei der von den ABI-Plattformen angewendeten Detektionsmethode entstehendes Artefakt handelt. Vorangehende Peaks sind manchmal verzerrt und weisen eine Basis auf, die auf der rechten Seite in Richtung des echten Peaks abfällt. Besonders offensichtlich ist dies beim Master-Mix der Specimen Control Size Ladder, bei dem vor dem bei 96 Nukleotiden (nt) auftretenden Peak ein vorangehender Peak bei 84 nt erscheint.
- 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. Gut vortexen.
- 7.5.2. In einer neuen 96-Well-PCR-Platte 10 µl Hi-Di Formamide mit ROX Size Standards in je einen Well für jede Reaktion geben.
- 7.5.3. 1 µl jeder PCR-Reaktion in einen Well mit Hi-Di Formamide mit ROX Size Standards übertragen.
  - In jedes Well nur 1 Probe geben.
  - Zum Vermischen 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. Ein **Probendatenblatt** und eine **Injektionsliste** für die Proben erstellen.
- 7.5.7. Die Proben auf einem ABI-Kapillarelektrophorese-Gerät gemäß dem Benutzerhandbuch vermessen.
  - Die Daten werden automatisch als größen- und farbspezifische Peaks angezeigt.
- 7.5.8. Profil und Kontrollen überprüfen und Ergebnisse auslesen. (Siehe Abschnitte 8: *Auswertung der Ergebnisse* und 10: *Erwartungswerte*).

### 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 PCR-Reaktion) an Hi-Di-Formamide mit LIZ Size Standards mischen. Gut vortexen.
- 7.5.10. In einer neuen 96-Well PCR-Platte 9,5 µl an Hi-Di-Formamide mit LIZ Size Standards in je ein Well für jede Reaktion geben.
- 7.5.11. 0,5 µl jeder PCR-Reaktion in das Well mit Hi-Di-Formamide mit LIZ Size Standards übertragen.
  - In jedes Well nur 1 Probe geben.
  - Zum Vermischen 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. Ein Probendatenblatt und eine Injektionsliste für die Proben erstellen.
- 7.5.15. Die Proben auf einem ABI 3500 Elektrophoreseinstrument gemäß Anweisungen im Benutzerhandbuch analysieren.
  - Die Daten werden automatisch als größen- und farbspezifische Peaks angezeigt.
- 7.5.16. Profil und Kontrollen überprüfen und Ergebnisse auslesen. (Siehe Abschnitte 8: *Auswertung der Ergebnisse* und 10: *Erwartungswerte*).

### 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 PCR-Reaktionen aufgrund falscher steriler Arbeitsweise zu prüfen. Außerdem kann eine Pufferkontrolle hinzugefügt werden, um auszuschließen, dass es zu einer Kontamination des für die Resuspension der Proben verwendeten Puffers gekommen ist. Die Werte für die positiven Kontrollen finden sich in Abschnitt *10.1 Erwartete Größe amplifizierter Produkte*. Zusätzliche Kontrollen und Sensitivitätskontrollen (Verdünnungen positiver Kontrollen in unserer negativen Kontrolle) können bei Invivoscribe bestellt werden.

## 7.7. Empfohlene Positivkontrollen

Die Amplikongrößen wurden mithilfe einer ABI-Plattform bestimmt. Die Amplikongrößen, die mit ihrem spezifischen Kapillarelektrophorese-Gerät bestimmt wurden, können je nach der verwendeten Nachweisplattform und der Version der Analysesoftware um 1 bis 4 Nukleotide (nt) von den hier aufgelisteten abweichen. Nach der initialen Identifikation stimmt die Amplikongröße bei jedem Lauf auf Ihrer Plattform überein. Diese Reproduzierbarkeit ist bei der Kontrolle auf ein Rezidiv einer Erkrankung äußerst nützlich.

**Hinweis:** „Farbe“ bezieht sich auf die Farbe der mit dem Master-Mix generierten Produkte, wenn auf ABI-Fluoreszenzdetektionssystemen die Standard-Farbuweisung verwendet wird.

Tabelle 6. Empfohlene Positivkontrollen

Master-Mix	Ziel	Farbe	Kontroll-DNA	Bestellnr.	Produktgröße in Nukleotiden (nt)
<b>IGH Tube A</b>	FR1-J <sub>H</sub>	Blau	<b>Gültiger Größenbereich</b> IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 40881750	<b>310 - 360</b> 280 <sup>a</sup> , 325
<b>IGH Tube B</b>	FR2-J <sub>H</sub>	Blau	<b>Gültiger Größenbereich</b> IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 40881750	<b>250 - 295</b> 260
<b>IGH Tube C</b>	FR3-J <sub>H</sub>	Grün	<b>Gültiger Größenbereich</b> IVS-0019 Clonal Control DNA	--- 40881090	<b>100 - 170</b> 145
<b>IGH Tube D</b>	D <sub>H</sub> -J <sub>H</sub>	Grün	<b>Gültiger Größenbereich</b> IVS-0024 Clonal Control DNA	--- 40881390	<b>110 - 290, 390 - 420</b> 139
<b>IGH Tube E</b>	D <sub>H</sub> 7-J <sub>H</sub>	Blau	<b>Gültiger Größenbereich</b> IVS-0008 Clonal Control DNA	--- 40880430	<b>100 - 130<sup>b</sup></b> 109
<b>Specimen Control Size Ladder</b>	Mehrere Gene	Blau	<b>Gültiger Größenbereich</b> IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	<b>96, 197, 297, 397, 602<sup>c</sup></b> 96, 197, 297, 397, 602 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Hinweis: Es kann auch ein Peak bei 280 nt auftreten. Dieser ist auf ein bekanntes Amplikon zurückzuführen, das knapp außerhalb des gültigen Größenbereichs für IGH Tube A liegt.

<sup>b</sup>Hinweis: Ein 209-nt-PCR-Produkt ist der kleinste Hintergrundpeak aus dem Keimbahn-Bereich D<sub>H</sub>7-J<sub>H</sub>1. Bei sehr effizienter PCR-Amplifikation können auch längere PCR-Produkte erhalten werden, da die Primer an downstream liegende J<sub>H</sub>-Genumlagerungen binden; z. B. 416 nt (D<sub>H</sub>7-J<sub>H</sub>2), 1028 nt (D<sub>H</sub>7-J<sub>H</sub>3) usw.

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

## 8. Auswertung 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 Assays mit Positivkontroll- und Negativkontrollproben bestimmt. Für eine genaue und aussagekräftige Interpretation sollten Peaks, die außerhalb des geltenden Größenbereichs für jeden Master-Mix liegen, ignoriert werden.

### 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 zu wiederholen, wenn die positiven oder negativen Kontrollreaktionen fehlschlagen.
- 8.1.3. Proben, die in duplikater Ausführung unterschiedliche Ergebnisse liefern, sollten neu getestet/bewertet werden, um ein Vertauschen der Proben auszuschließen.
- 8.1.4. Sämtliche Assay-Kontrollen müssen vor der Bewertung der Analyseergebnisse untersucht werden. Liefern die Kontrollen nicht die korrekten Ergebnisse, ist der Assay ungültig, und die Proben können nicht ausgewertet werden.

**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	Abweichendes Ergebnis
<b>No-Template-Kontrolle</b>	Keine Amplifikation vorhanden, mit der Analyse fortfahren	Amplifikation vorhanden, Assay wiederholen.
<b>Polyklonale Kontrolle</b>	Die Produktgröße entspricht den erwarteten Werten, 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.
<b>Positivkontrolle</b> (Hierbei kann es sich auch um eine Extraktionskontrolle handeln, wenn positives Kontrollmaterial durch Extraktionsprozesse geführt wird)	Die Produktgröße entspricht den erwarteten Werten, die in Abschnitt 10.1 <i>Erwartete Größe amplifizierter Produkte</i> aufgeführt werden. Mit der Analyse fortfahren.	Assay wiederholen.
<b>Specimen Control Size Ladder</b> (Diese Amplifikationskontrolle ist für Proben unbekannter Menge und Qualität <u>unverzichtbar</u> .)	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 nt-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. Interpretation der Proben

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

- Ein oder zwei signifikante positive Peaks<sup>a</sup> innerhalb des gültigen Größenbereichs sind wie folgt anzugeben:  
**„Positiv auf Erkennung von klonalen Genumlagerungen der Immunglobulin-Schwerkette in Übereinstimmung mit dem Vorhandensein einer klonalen Zellpopulation. Im Kontext der Gesamtheit der diagnostischen Kriterien können klonale Zellpopulationen auf eine hämatologische Malignität hinweisen.“**
- Die Abwesenheit positiver Peaks<sup>a</sup> innerhalb des gültigen Größenbereichs sind wie folgt anzugeben:  
**„Negativ auf Erkennung von klonalen Genumlagerungen der Immunglobulin-Schwerkette.“**

<sup>a</sup>**Hinweis:** Die Kriterien zur Definition positiver Peaks sind wie folgt:

- Produkte aus einer **diagnostischen Probe**, 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 einer anfänglichen Diagnose entnommen wurden** und im gültigen Größenbereich liegen und eine der folgenden Bedingungen erfüllen sind positive Peaks:
  - 1) die Amplitude ist mindestens um einen Faktor drei größer als der drittgrößte Peak; **ODER**,
  - 2) die Amplitude ist größer als die der benachbarten Peaks und identisch mit den klonalen Amplikonprodukten, die zuvor vom selben Patienten mit demselben Master-Mix erzeugt wurden.

## 9. Anwendungsgrenzen des Verfahrens

- Dieser Assay kann nicht 100 % der klonalen Zellpopulationen erfassen.
- Dieser Assay kann weniger als eine positive Zelle pro 100 normaler Zellen nicht zuverlässig nachweisen.
- Die Ergebnisse molekularer Klonalitätsassays 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 Größe amplifizierter Produkte

Die Amplikongrößen wurden mithilfe einer ABI-Plattform bestimmt. Die auf jedem Kapillarelektrophorese-Gerät nachgewiesenen Amplikongrößen können je nach der verwendeten Nachweisplattform und der Version der Analysesoftware um 1 bis 4 Nukleotide (nt) von den hier aufgelisteten abweichen. Nach der initialen Identifikation stimmt die Amplikongröße bei jedem Lauf auf jeder spezifischen Plattform überein. Diese Reproduzierbarkeit ist bei der Kontrolle auf ein Rezidiv einer Erkrankung äußerst nützlich.

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

Tabelle 8. Erwartete Größe amplifizierter Produkte

Master-Mix	Ziel	Farbe	Kontroll-DNA	Bestellnr.	Produktgröße in nt
<i>IGH</i> Tube A	FR1-J <sub>H</sub>	Blau	<b>Gültiger Größenbereich</b>	---	<b>310 - 360</b>
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	310 - 360
			IVS-0030 Clonal Control DNA	40881750	280 <sup>a</sup> , 325
			IVS-0019 Clonal Control DNA	40881090	345
			IVS-0024 Clonal Control DNA	40881390	342
<i>IGH</i> Tube B	FR2-J <sub>H</sub>	Blau	<b>Gültiger Größenbereich</b>	---	<b>250 - 295</b>
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	250 - 295
			IVS-0030 Clonal Control DNA	40881750	260
			IVS-0019 Clonal Control DNA	40881090	285
			IVS-0024 Clonal Control DNA	40881390	277
<i>IGH</i> Tube C	FR3-J <sub>H</sub>	Grün	<b>Gültiger Größenbereich</b>	---	<b>100 - 170</b>
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	100 - 170
			IVS-0019 Clonal Control DNA	40881090	145
<i>IGH</i> Tube D	D <sub>H</sub> -J <sub>H</sub>	Grün	<b>Gültiger Größenbereich</b>	---	<b>110 - 290, 390 - 420</b>
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	235-258, 344 <sup>b</sup>
			IVS-0030 Clonal Control DNA	40881750	--- <sup>c</sup>
			IVS-0019 Clonal Control DNA	40881090	--- <sup>c</sup>
			IVS-0024 Clonal Control DNA	40881390	139
			IVS-0008 Clonal Control DNA	40880430	--- <sup>c</sup>
<i>IGH</i> Tube E	D <sub>H</sub> 7-J <sub>H</sub>	Blau	<b>Gültiger Größenbereich</b>	---	<b>100 - 130</b>
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	209 <sup>d</sup> , 416 <sup>d</sup>
			IVS-0030 Clonal Control DNA	40881750	--- <sup>e</sup>
			IVS-0019 Clonal Control DNA	40881090	--- <sup>e</sup>
			IVS-0024 Clonal Control DNA	40881390	--- <sup>e</sup>
			IVS-0008 Clonal Control DNA	40880430	109
Specimen Control Size Ladder	Mehrere Gene	Blau	<b>Gültiger Größenbereich</b>	---	<b>96, 197, 297, 397, 602<sup>f</sup></b>
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	96, 197, 297, 397, 602 <sup>f</sup>

<sup>a</sup>Hinweis: Es kann auch ein Peak bei 280 nt auftreten. Dieser ist auf ein bekanntes Amplicon zurückzuführen, das knapp außerhalb des gültigen Größenbereichs für *IGH* Tube A liegt.

<sup>b</sup>Hinweis: Ein nicht spezifischer Peak bei 344 nt ist das Ergebnis einer Kreuzhybridisierung des D<sub>H</sub>2-Primers an eine Sequenz in der Region, die upstream von J<sub>H</sub>4 liegt. In der Fragmentanalyse ko-migriert dieser Peak nicht mit D-J-Produkten.

<sup>c</sup>Hinweis: Nicht spezifische Peaks bei 74, 94, 158, 176, 187, 200 und 344 nt treten bei vielen verschiedenen Zelllinien auf. Diese Banden treten vor einem polyklonalen Hintergrund nicht auf.

<sup>d</sup>Hinweis: Ein 209-nt-PCR-Produkt ist der kleinste Hintergrundpeak aus dem Keimbahn-Bereich D<sub>H</sub>7-J<sub>H</sub>1. Bei sehr effizienter PCR-Amplifikation können auch längere PCR-Produkte erhalten werden, da die Primer an downstream liegende J<sub>H</sub>-Genumlagerungen binden; z. B. 416 nt (D<sub>H</sub>7-J<sub>H</sub>2), 1028 nt (D<sub>H</sub>7-J<sub>H</sub>3) usw.

<sup>e</sup>Hinweis: Nicht spezifische Peaks mit 79 und 123 nt treten bei vielen verschiedenen Zelllinien auf. Diese Banden treten vor einem polyklonalen Hintergrund nicht auf.

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

## 10.2. Probandaten

Die folgenden Daten wurden mit dem angegebenen Master-Mix erhalten. Die amplifizierten Produkte wurden mit einem ABI-Instrument analysiert.

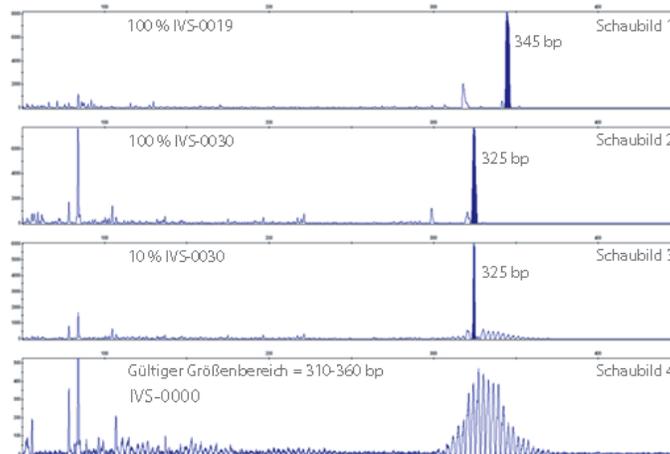


Abbildung 2. IGH Tube A

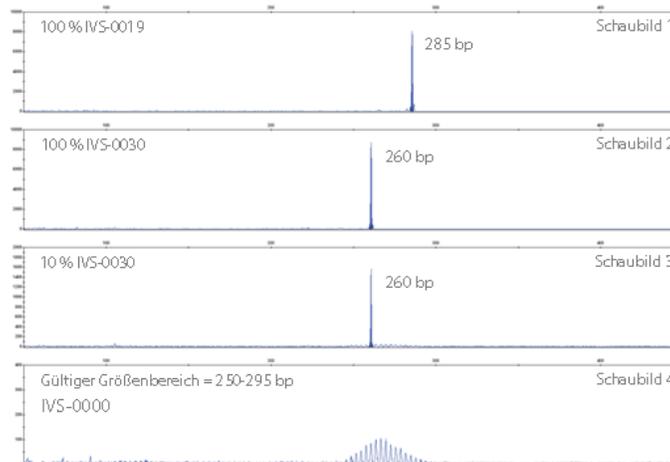


Abbildung 3. IGH Tube B

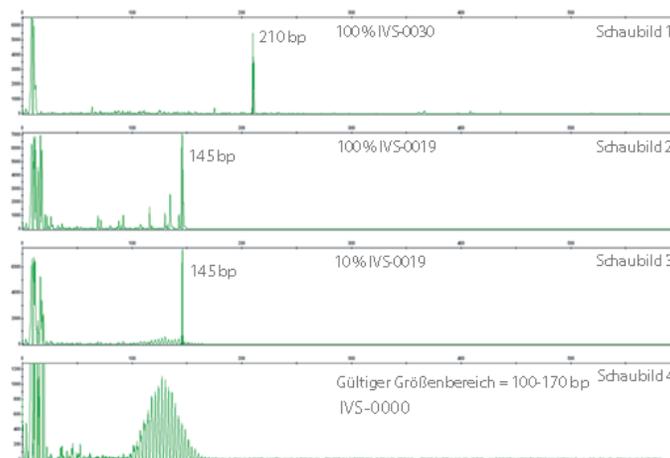


Abbildung 4. IGH Tube C

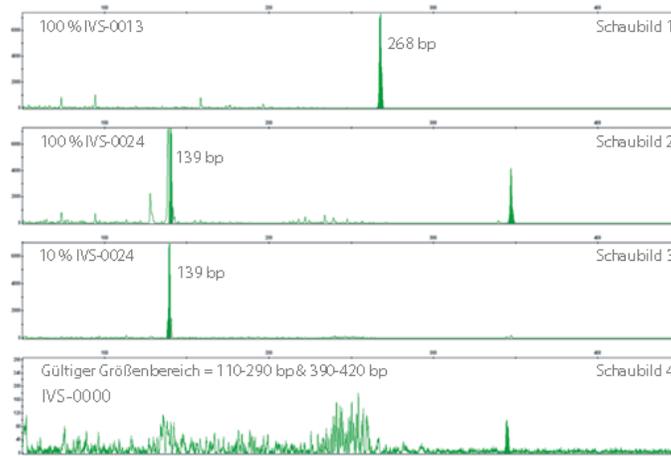


Abbildung 5. IGH Tube D

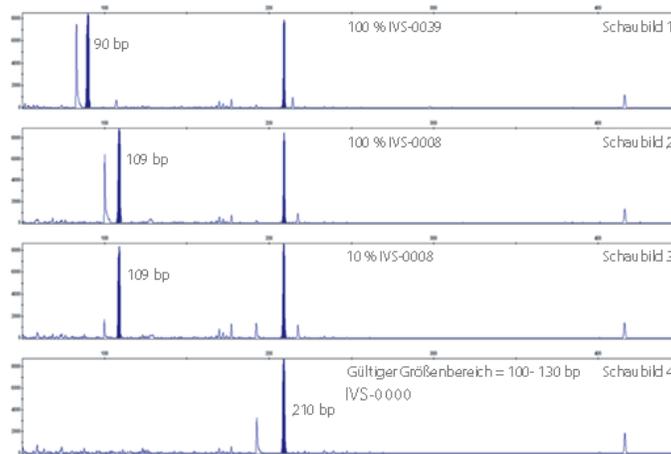


Abbildung 6. IGH Tube E

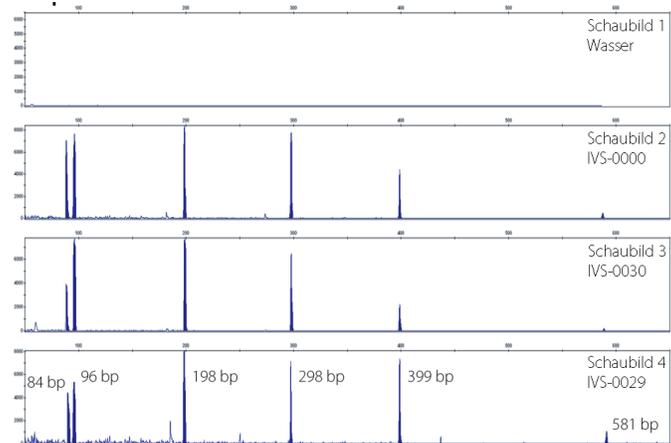


Abbildung 7. Specimen Control Size Ladder Master Mix

## 11. Leistungseigenschaften

Der IdentiClone *IGH* Gene Clonality PCR Assay 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 wurde in zwei nennenswerten Artikeln aufgezeigt.<sup>2,3</sup>

Tabelle 9. Konkordanzstudien

	PCR/SB-Konkordanz: <sup>2</sup>	PCR/SB-Konkordanz: <sup>3</sup>
<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 %

Eine unabhängige Studie von Sandberg *et al.* umfasste 300 Proben von Patienten mit einer Vielzahl von Probenarten.<sup>3</sup> In den Fällen, in denen sowohl PCR- als auch SB-Analysen durchgeführt wurden und die Ergebnisse mit histopathologischen Ergebnissen und der abschließenden Diagnose verglichen werden konnten, lag die diagnostische Genauigkeit ausgewählter IdentiClone-Assays bei mindestens 96 %. Dies ist weitaus genauer als die SB-Analyse, die in dieser Studie 23 Fälle von Malignität und 7 mögliche Malignitäten nicht erkannte. Mit den IdentiClone-Assays traten keine eindeutig falsch-positiven Ergebnisse auf und die Präzision war sehr hoch.<sup>3</sup> Ein weiterer Vorteil dieses Assays war, dass die erhaltenen klonalen Ergebnisse den nachfolgenden Nachweis patienten- und tumorspezifischer Genumlagerungen auf minimale Resterkrankungen ermöglichten.

## 12. Referenzen

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

## 13. Technischer Kundendienst

Vertreter des technischen Kundendienstes und des Kundendienstes stehen von Montag bis Freitag für telefonische Anfragen und Anfragen per E-Mail oder über die Website zur Verfügung.

### 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](mailto:support@invivoscribe.com) | Kundenbetreuung: [sales@invivoscribe.com](mailto:sales@invivoscribe.com) | Webseite: [www.invivoscribe.com](http://www.invivoscribe.com)

## 14. Symbole

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

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

## 15. Rechtliche Hinweise

### 15.1. Gewährleistung und Haftung

Invivoscribe, Inc. (Invivoscribe®) setzt sich dafür ein, hochwertigste Produkte herzustellen. Invivoscribe® garantiert, dass die Produkte, die in der Gebrauchsanweisung beschriebenen Leistungsstandards erreichen oder übertreffen, falls Produkt eine derartige Packungsbeilage enthält. Wird ein Produkt von Produktspezifikationen abgedeckt und entspricht die Leistung nicht diesen Spezifikationen, so ist es unsere Richtlinie, das Produkt zu ersetzen oder den vollen Kaufpreis gutzuschreiben. Invivoscribe® gibt keine sonstigen ausdrücklichen oder implizierten Garantien. Die Haftung von Invivoscribe® beschränkt sich auf den Kaufpreis des Produkts. Invivoscribe übernimmt keine Haftung für direkte, indirekte, resultierende oder inzidentelle Schäden, die durch den Einsatz, die Ergebnisse eines Einsatzes oder das Unvermögen eines Einsatzes seines Produkts ergeben; Die Wirksamkeit des Produkts im Labor des Käufers unter vom Käufer kontrollierten Bedingungen muss im Rahmen von vom Käufer definierte und kontrollierte Prozesse festgelegt und kontinuierlich überprüft werden. Hierzu zählt auch, bei jedem Probenentest auch Positiv-, Negativ- und Leerkontrollen zu testen. Die Bestellung, Akzeptanz und Verwendung des Produkts bedeutet, dass der Käufer die alleinige Verantwortung für die Sicherstellung der Produktwirksamkeit akzeptiert und mit der in diesem Abschnitt dargelegten Haftungsbeschränkung einverstanden ist.

Dieses Produkt ist ein *In-vitro*-Diagnostikum und ist nicht für den Verkauf oder eine Anwendung in Nordamerika erhältlich.

### 15.2. Patente und Marken

Dieses Produkt ist durch eines oder mehrere folgender Patente bzw. Marken abgedeckt: Europäische Patentnummer 1549764, Europäische Patentnummer 2418287, Europäische Patentnummer 2460889, Japanische Patentnummer 4708029, US-Patent 8859748 und damit zusammenhängende anstehende oder künftige Anwendungen. 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 Marke 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.