

Gebrauchsanweisung



## IdentiClone® *IGH* + *IGK* B-Cell Clonality Assay

Zur Identifizierung von klonalen Umlagerungen des Gens für die schwere Immunglobulinkette und die Immunglobulin-Kappa-Leichtkette.

**IVD** Für die *In-vitro*-Diagnostik.



 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
<b>REF</b> 9100031	IdentiClone <i>IGH</i> + <i>IGK</i> B-Cell Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Reaktionen
<b>REF</b> 9100041	IdentiClone <i>IGH</i> + <i>IGK</i> B-Cell Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Reaktionen

# Inhaltsverzeichnis

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

## 1. Verwendungszweck

Der IdentiClone *IGH + IGK* B-Cell Clonality Assay ist ein In-vitro-Diagnostikum für die PCR-basierte Detektion klonaler Umlagerungen des Gens für die schwere Immunglobulinkette und die Immunglobulin-Kappa-Leichtkette bei Patienten, bei denen Lymphproliferationen vermutet werden. Insbesondere kann der *IGH + IGK* B-Cell 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* und *IGK* -Genumlagerungen) für die Nachbehandlungsüberwachung
- Überwachung und Beurteilung von Krankheitsrückfällen

## 2. Zusammenfassung und Erläuterung des Assays

### 2.1. Hintergrund

Umlagerungen der Antigen-Rezeptor-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 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 DNA-Konsens-Primer, die an die konservierten Genregionen in den schweren Immunglobulinketten- und der Immunglobulin-Kappa-Leichtketten-Gene binden. Dieser DNA-basierte Assay wird für den Nachweis der überwiegenden Mehrheit klonaler B-Zell-Malignitäten 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. Aus den Ergebnissen der Studie BIOMED-2 geht hervor, dass Umlagerungen der *IGH*- und *IGK*-Gene die Zuverlässigkeit und Empfindlichkeit der Tests verbessern können.<sup>2</sup> Darüber hinaus führt der Test auf Umlagerungen des *IGH*- und des *IGK*-Gens zu einer Empfindlichkeit von 99 % gegenüber 88 % bei alleiniger Testung auf *IGH* und 88 % bei alleiniger Testung auf *IGK*. Dadurch erhöht sich auch die Zuverlässigkeit der Tests, weil die Wahrscheinlichkeit, dass die klonalen Produkte in mehr als einem Röhrchen nachgewiesen werden, erhöht ist.<sup>4</sup>

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.

### 2.2. Zusammenfassung

Das Assaykit umfasst sechs (6) Master-Mixe. Die *IGH* Tubes A, B und C (*IGH*-Röhrchen A, B und C) Master-Mixe zielen auf die Framework-Regionen 1, 2 bzw. 3 in der variablen und der verknüpfenden Regionen des Genlocus der schweren Immunglobulinketten ab. Der *IGK* Tube A (*IGK*-Röhrchen A) Master-Mix zielt auf die variablen (V) und verknüpfenden (joining, J) Regionen des IG-Kappa-Leichtketten-Locus ab. Der *IGK* Tube B (*IGK*-Röhrchen B) Master-Mix hingegen zielt auf die Kappa-Deleting-Element ( $K_{de}$ )-Umlagerungen mit der variablen (V) Region und der intragenischen  $J\kappa$ - $C\kappa$ -Region ab. Die so entstehenden  $V\kappa$ - $K_{de}$  und  $J\kappa$ - $C\kappa$ -Intron- $K_{de}$ -Umlagerungen sind das Produkt einer nicht erfolgreichen Umlagerung der B-Zelle. 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 Nukleotiden (nt), um sicherzustellen, dass Qualität und Quantität der eingesetzten DNA für den Erhalt eines gültigen Ergebnisses ausreichen. 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.

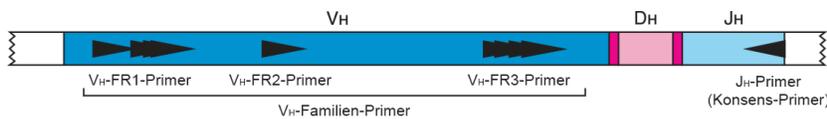
Dieser Assay basiert auf der Euroclonality/BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.



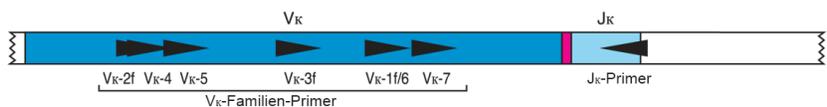
### 3. Verfahrensgrundlagen

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

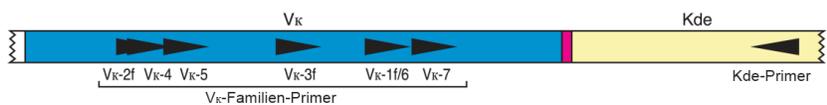
PCR-Assays werden routinemäßig zur Identifizierung klonaler B-Zell-Populationen verwendet. Diese Tests amplifizieren die DNA zwischen Primern, die das konservierte Gerüst (Framework, FR) und die konservierten verknüpfenden Regionen (joining, J) (*IGH* Tubes A–C [Röhrchen A–C]), die variablen (V) und die verknüpfenden (joining, J) Regionen (*IGK* Tube A [Röhrchen A]) und die variable  $J\kappa$ - $C\kappa$ -Intron- und die  $K_{de}$ -Region (*IGK* Tube B [Röhrchen B]) zum Ziel haben. Diese konservierten Regionen liegen auf beiden Seiten eines Bereichs innerhalb der V-J-Region, in dem während der Reifung aller B- und T-Lymphozyten programmierte Genumlagerungen stattfinden. Bei den eine Umlagerung durchlaufenden Antigen-Rezeptor-Genen handelt es sich um die Gene der leichten und schweren Immunglobulinketten in B-Zellen und die T-Zell-Rezeptorgene in T-Zellen. Jede B- und T-Zelle hat eine produktive V-J-Umlagerung, die hinsichtlich Länge und Sequenz einmalig ist. Daher entsteht innerhalb eines zu erwartenden Größenbereichs eine glockenförmige Kurve (Gaußsche Normalverteilung) der Amplikonprodukte, wenn DNA einer normalen oder polyklonalen Population mithilfe von vor und nach der V-J-Region bindenden Primern amplifiziert wird, sodass die heterogene Population von V-J-Umlagerungen widergespiegelt wird. DNA aus Proben mit einer klonalen Population liefert ein oder zwei prominente amplifizierte Produkte (Amplikons) in einem verminderten polyklonalen Hintergrund.



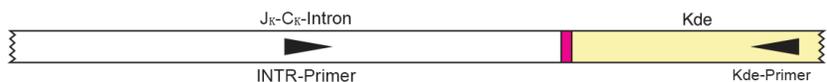
*IGH*-Tube A (*IGH*-Röhrchen A): 6 V<sub>H</sub>-FR1-Primer + J<sub>H</sub>-Konsens-Primer  
*IGH*-Tube B (*IGH*-Röhrchen B): 7 V<sub>H</sub>-FR2-Primer + J<sub>H</sub>-Konsens-Primer  
*IGH*-Tube C (*IGH*-Röhrchen C): 7 V<sub>H</sub>-FR3-Primer + J<sub>H</sub>-Konsens-Primer



*IGK*-Tube A (*IGK*-Röhrchen A): 6 V<sub>K</sub>-Primer – 2



*IGK*-Tube B (*IGK*-Röhrchen B): 6 V<sub>K</sub>-Primer und INTR-Primer + 1



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 Amplikonprodukte, die rund um die statistisch bevorzugte Umlagerung eine Gaußsche Normalverteilung bilden, identifiziert. Die Primer, die verschiedene FR-Regionen in drei unterschiedlichen Abschnitten des Schwerketten-Gens amplifizieren, erzeugen entsprechend verschiedene Größenbereiche an V-J-Produkten. Bei Umlagerungen des *IGK*-Gens ist die Länge des CDR3-Abschnitts begrenzt und solche Umlagerungen zeigen eine signifikante Verzerrung (Platykurtose). Daher weisen PCR-Produkte eine sehr enge Gaußsche Verteilung auf und lassen sich am einfachsten und zuverlässigsten durch Heteroduplex-Analyse identifizieren.

#### 3.2. Differentielle Fluoreszenzdetektion

Die differentielle Fluoreszenzdetektion wird üblicherweise verwendet, um die Amplikonprodukte 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

**Abbildung 1.** Gezeigt ist eine einfache Darstellung der Organisation eines umgeordneten Gens für die schwere Immunglobulinkette (*IGH*) auf Chromosom 14 und des Gens für die Immunglobulin-Kappa-Leichtkette auf Chromosom 2p11.2. Die schwarzen Pfeile zeigen auf die relativen Positionen von Primern für das konservierte Framework-Gensegment (FR1-3) und die nachgelagerten Konsenssegmente des J<sub>H</sub>-Gens für *IGH* sowie der V<sub>K</sub>-, J<sub>K</sub>-, INTR- und K<sub>de</sub>-Primer, die in den *IGK*-Master-Mix-Röhrchen enthalten sind. Die Amplikonprodukte, die aus jeder dieser Regionen erzeugt werden, können unter Verwendung von fluoreszierenden Primersets in Kapillarelektrophorese-Instrumenten mit differentieller Fluoreszenzdetektion voneinander unterschieden werden.

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 Nukleotiden. Diese Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit in Verbindung mit der automatischen Archivierung von Probandaten ermöglicht die Überwachung, Nachverfolgung und den Vergleich von Daten einzelner Patienten im Zeitverlauf.

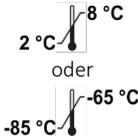
## 4. Reagenzien

### 4.1. Reagenzienbestandteile

Tabelle 1: Verfügbare Assays

Katalognummer	Beschreibung	Menge
 91000031	IdentiClone <i>IGH</i> + <i>IGK</i> B-Cell Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Reaktionen
 91000041	IdentiClone <i>IGH</i> + <i>IGK</i> B-Cell Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Reaktionen

Tabelle 2. Kit-Bestandteile

Reagenz	Katalognummer	Reagenzienbestandteile (Wirkstoffe)	Verpackungseinheit	91000031 Anzahl der Einheiten	91000041 Anzahl der Einheiten	Lagerungstemp.
Master-Mixe	21010011CE	<b><i>IGH</i>Tube A (<i>IGH</i>-Röhrchen A) – 6FAM</b> Mehrere Oligonukleotide, die auf die FR-Region 1 des Immunglobulin-Schwerketten-Gens abzielen, in gepufferter Salzlösung.	1500 µL	1	10	
	21010101CE	<b><i>IGH</i>Tube B (<i>IGH</i>-Röhrchen B) – 6FAM</b> Mehrere Oligonukleotide, die auf die FR-Region 2 des Immunglobulin-Schwerketten-Gens abzielen, in gepufferter Salzlösung.	1500 µL	1	10	
	21010031CE	<b><i>IGH</i>Tube C (<i>IGH</i>-Röhrchen C) – HEX</b> Mehrere Oligonukleotide, die auf die FR-Region 3 des Immunglobulin-Schwerketten-Gens abzielen, in gepufferter Salzlösung.	1500 µL	1	10	
	21020011CE	<b><i>IGK</i>Tube A (<i>IGK</i>-Röhrchen A) – 6FAM</b> Mehrere Oligonukleotide, die auf die variablen und verknüpfenden Regionen des Gens der Immunglobulin-Kappa-Leichtkette abzielen, in gepufferter Salzlösung.	1500 µL	1	10	
	21020021CE	<b><i>IGK</i>Tube B (<i>IGK</i>-Röhrchen B) – 6FAM</b> Mehrere Oligonukleotide, die auf die variablen $J\kappa$ - $C\kappa$ -Intron und $K_{de}$ -Regionen des Gens der Immunglobulin-Kappa-Leichtkette abzielen, in gepufferter Salzlösung.	1500 µL	1	10	
Master-Mix für die Amplifikationskontrolle	20960021	<b>Specimen Control Size Ladder (Probenkontroll-Größenleiter) – 6FAM</b> Mehrere Oligonukleotide, die an Housekeeping-Gene binden.	1500 µL	1	10	
Positiv-Kontroll-DNAs	40881750	<b>IVS-0030 Clonal Control DNA (klonale Kontroll-DNA)</b> 200 µg/mL DNA in 1/10-TE-Lösung	100 µL	1	5	
	40881090	<b>IVS-0019 Clonal Control DNA (klonale Kontroll-DNA)</b> 200 µg/mL DNA in 1/10-TE-Lösung	100 µL	1	5	
	40880370	<b>IVS-0007 Clonal Control DNA (klonale Kontroll-DNA)</b> 200 µg/mL DNA in 1/10-TE-Lösung	100 µL	1	5	
Negative (normale) Kontroll-DNA	40920010	<b>IVS-0000 Polyclonal Control DNA (polyklonale Kontroll-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. 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 eines anderen Herstellers. 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 des Master-Mixes oder die Probenaufbereitung 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 längere Zeit 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™ Dx Thermocycler oder ein vergleichbares Gerät
- 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
- Leistungseigenschaften und Spezifikation:
  - Die folgenden Kapillarelektrophorese-Geräte erfüllen die Leistungsanforderungen für diesen Assay:
    - ABI 310 Genetic Analyzer (1-capillary) (Genanalysator [1 Kapillare])
    - 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** 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)
- 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. Probenvorbereitung

Die genomische DNA so schnell wie möglich aus 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 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 wird sichergestellt, dass DNA von ausreichender Qualität und Quantität vorhanden war, um ein gültiges Ergebnis zu erzielen.

### 6.5. Probenlagerung

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

Katalognummer	Beschreibung
21010011CE	<i>IGH</i> Tube A ( <i>IGH</i> -Röhrchen A) – 6FAM
21010101CE	<i>IGH</i> Tube B ( <i>IGH</i> -Röhrchen B) – 6FAM
21010031CE	<i>IGH</i> Tube C ( <i>IGH</i> -Röhrchen C) – HEX
21020011CE	<i>IGK</i> Tube A ( <i>IGK</i> -Röhrchen A) – 6FAM
21020021CE	<i>IGK</i> Tube B ( <i>IGK</i> -Röhrchen B) – 6FAM
20960021	Specimen Control Size Ladder (Probenkontroll-Größenleiter) – 6FAM
40881750	IVS-0030 Clonal Control DNA (klonale Kontroll-DNA)
40881090	IVS-0019 Clonal Control DNA (klonale Kontroll-DNA)
40880370	IVS-0007 Clonal Control DNA (klonale Kontroll-DNA)
40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (polyklonale Kontroll-DNA)

### 7.2. Erforderliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)

Tabelle 4. Erforderliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)

Reagenz/Material	Empfohlene Reagenzien/Materialien und Anbieter	Katalognummer	Anmerkungen
<b>DNA-Polymerase</b>	Roche: <ul style="list-style-type: none"> <li>EagleTaq DNA Polymerase (DNS-Polymerase)</li> </ul> Invivoscribe, Inc.: <ul style="list-style-type: none"> <li>FalconTaq DNA Polymerase oder gleichwertige Polymerase</li> </ul>	05206944190 60970130	keine Angabe
<b>Glasdestilliertes, entionisiertes, hochreines Wasser für die Molekularbiologie oder USP-Wasser</b>	keine Angabe	keine Angabe	steril und frei von DNase und RNase
<b>Kalibrierte Pipetten</b>	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>	keine Angabe	müssen für die genaue Messung von Volumina zwischen 1 µL und 1000 µL geeignet sein
<b>Thermocycler</b>	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>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>	keine Angabe	keine Angabe
<b>Vortexmischer</b>	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
<b>PCR-Platten oder -Röhrchen</b>	keine Angabe	keine Angabe	steril
<b>Pipettenspitzen mit Filter</b>	keine Angabe	keine Angabe	steril, ohne RNase/DNase/Pyrogene
<b>Mikrozentrifugengefäße</b>	keine Angabe	keine Angabe	steril
<b>ABI- Kapillarelektrophorese-Gerät</b>	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>ABI 310-, 3100- oder 3500-Serie</li> </ul>	keine Angabe	keine Angabe
<b>Hi-Di-Formamid</b>	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hi-Di™-Formamid</li> </ul>	4311320	keine Angabe
<b>Längenstandards</b>	Invivoscribe: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hi-Di-Formamid mit ROX-Größenstandards für ABI 3100</li> </ul>	60980061	keine Angabe

Tabelle 4. Erforderliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)

Reagenz/Material	Empfohlene Reagenzien/Materialien und Anbieter	Katalognummer	Anmerkungen
Längenstandards	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>	402985 4408399	keine Angabe
Dye Sets für spektrale Kalibrierung	Applied Biosystems:		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>für Instrumente der Serie ABI 3100 und 3130: <ul style="list-style-type: none"> <li>DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D) (Matrix-Standard-Kit [Farbstoffset D])</li> </ul> </li> <li>für Instrumente der Serie ABI 310: <ul style="list-style-type: none"> <li>NED Matrix Standard</li> <li>und Fluorescent Amidite Matrix Standards [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX]</li> </ul> </li> <li>für Instrumente der Serie ABI 3500: <ul style="list-style-type: none"> <li>DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5) (Matrix-Standard-Kit [Farbstoffset G5])</li> </ul> </li> </ul>	4345827 402996 401546 4345833	keine Angabe
	Applied Biosystems:		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>POP-4™-Polymer: <ul style="list-style-type: none"> <li>POP-4 für 310 Genetic Analyzers</li> <li>POP-4 für 3100/3100-Avant Genetic Analyzers</li> <li>POP-4 für 3130/3130xL Genetic Analyzers</li> </ul> </li> <li>POP-7™-Polymer: <ul style="list-style-type: none"> <li>POP-7 für 3130/3130xL Genetic Analyzers</li> <li>POP-7 für 3500/3500xL Genetic Analyzers</li> </ul> </li> </ul>	402838 4316355 4352755 4352759 4393714	keine Angabe
Puffer	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>10X Puffer für Genanalysatoren mit EDTA</li> </ul>	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 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. Wenn doppelte Tests nicht übereinstimmende Ergebnisse liefern, ist ein erneuter Test oder eine erneute Beurteilung 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 Negativkontrolle (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. 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 Aliquote beträgt für jede Reaktion **45 µL**.
- Wir empfehlen, für jeweils 15 Reaktionen eine zusätzliche Reaktion anzusetzen, 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)
<b>+ 1</b>	Positiv-Kontroll-DNA (Siehe Abschnitt 7.7: <i>Empfohlene Positivkontrollen</i> )
<b>+ 1</b>	Negativ-Kontroll-DNA (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
<b>+ 1</b>	Nicht-Template-Kontrolle (Wasser)
<b>+ 1</b>	zum Ausgleich von Pipettierfehlern
<b>n = 2 × Anzahl an Proben + 4</b>	<b>gesamt</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
<b>m = Anzahl an Proben + 3</b>	<b>gesamt</b>

- Das Gesamt-Aliquotvolumen für den Specimen Control Size Ladder Master Mix = **m × 45 µL**.
- 7.3.3. 1,25 U (oder 0,25 µL bei 5 U/µL) Taq-DNA-Polymerase pro Reaktion zu jedem Master-Mix hinzugeben.
- Das Gesamtvolumen der zum Specimen Control Size Ladder Master Mix hinzugegebenen Taq-DNA-Polymerase beträgt **n × 0,25 µL** und **m × 0,25 µL** für den Master-Mix der Specimen Control Size Ladder.
  - Zum Vermischen behutsam vortexen.
- 7.3.4. Für jede Reaktion 45 µL des relevanten Master-Mixes + 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 Mischen mehrmals auf- und abpipettieren.
- 7.3.6. Die PCR-Platte verschließen oder abdecken.
- Die Proben können nun auf einem Thermocycler amplifiziert werden.
  - 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 × 45 µL** Master-Mix**n × 0,25 µL** 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. 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.
- Ogleich 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

Es ist zu beachten, dass bei der ABI-Fluoreszenzdetektion häufig ein vorab auftretender Peak zu sehen ist und aufgrund der von den ABI-Plattformen verwendeten Detektionsmethode ein Artefakt darstellt. Vorangehende Peaks sind mitunter verzerrt und haben eine Basis, die auf der rechten Seite zum realen Peak hin abfällt. Besonders offensichtlich ist dies beim Specimen Control Size Ladder Master Mix, der bei dem vor dem bei 96 Nukleotiden auftretenden Peak ein vorangehender Peak bei 84 Nukleotiden erscheint.

- Multiplexen von PCR-Produkten mit verschiedenen Master-Mixen führt zu einer Reduktion der Gesamtempfindlichkeit des Assays.

### 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 Reaktion) an Hi-Di-Formamid mit ROX-Größenstandards mischen. 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 einen 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.
  - Die Daten werden automatisch als größen- und farbspezifische Peaks angezeigt.
- 7.5.8. Das Profil und die Kontrollen überprüfen und einen Ergebnisbericht erstellen. (Siehe Abschnitte 8: *Auswertung der Ergebnisse* und 10: *Erwartungswerte* unten.)

### 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-Formamid mit LIZ-Größenstandards mischen. Gut auf dem Vortex mischen.
- 7.5.10. In einer neuen 96-Well PCR-Platte 9,5 µl Hi-Di-Formamid mit LIZ-Größenstandards in je ein Well für jede PCR geben.
- 7.5.11. 0,5 µL jeder PCR 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 den Anweisungen im Benutzerhandbuch trennen.
  - 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* unten.)

## 7.6. Qualitätskontrolle

Positiv- und Negativkontrolle (oder Normalkontrolle) werden im Kit mitgeliefert und sind in einfacher Ausführung bei jeder Durchführung des Assays durchzuführen, um die Leistung des Assays sicherzustellen. Zusätzlich sollte außerdem eine Nicht-Template-Kontrolle (z. B. Wasser) durchgeführt werden, um auf Kontaminationen des Master-Mixes oder Kreuzkontamination der PCR-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 10.1 *Erwartete Länge der amplifizierten Produkte*. Zusätzliche Kontrollen und Sensitivitätskontrollen (Verdünnungen von Positivkontrollen in einer Negativkontrolle) können bei Invivoscribe bestellt werden.

## 7.7. Empfohlene Positivkontrollen

Die aufgeführten Amplikon-Größen wurden mithilfe einer ABI-Plattform bestimmt. Die mit Ihrem vorhandenen Kapillarelektrophorese-Gerät gemessenen Amplikon-Größen können sich je nach Detektionsplattform und Version der verwendeten Analyse-Software um 1 bis 4 Nukleotide (nt) 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-Farbuweisung verwendet wird.

**Tabelle 6.** Erwartete Größen empfohlener Positivkontrollen

Master-Mix	Ziel	Farbe	Kontroll-DNA	Katalognummer	Produktgröße in Nukleotiden (nt)
<i>IGH</i> Tube A	FR1-J <sub>H</sub>	Blau	<b>gültiger Längenbereich</b> IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 40881750	<b>310–360</b> 280 <sup>a</sup> , 325
<i>IGH</i> Tube B	FR2-J <sub>H</sub>	Blau	<b>gültiger Längenbereich</b> IVS-0030 Clonal Control DNA	--- 40881750	<b>250–295</b> 260
<i>IGH</i> Tube C	FR3-J <sub>H</sub>	Grün	<b>gültiger Längenbereich</b> IVS-0019 Clonal Control DNA	--- 40881090	<b>100–170</b> 145
<i>IGK</i> Tube A	V <sub>κ</sub> -J <sub>κ</sub>	Blau	<b>gültiger Längenbereich</b> IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40880370	<b>120–160, 190–210, 260–300</b> 143
<i>IGK</i> Tube B	V <sub>κ</sub> -K <sub>de</sub> + Intron-K <sub>de</sub>	Blau	<b>gültiger Längenbereich</b> IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40880370	210–250, 270–300, 350–390 274, 282
<b>Specimen Control Size Ladder</b>	mehrere Gene	Blau	<b>gültiger Längenbereich</b> IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	<b>96, 197, 297, 397, 602<sup>b</sup></b> 96, 197, 297, 397, 602 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>**Hinweis:** Es kann auch eine Bande bei 280 nt auftreten. Diese ist auf ein bekanntes Amplikon zurückzuführen, das knapp außerhalb des gültigen Größenbereichs für *IGH* Tube A (*IGH*-Röhrchen A) liegt.

<sup>b</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.

## 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 Laboregebnisse 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 jede der Master-Mixes 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. 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>Nicht-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 Länge der amplifizierten Produkte</i> aufgeführt werden. Keine klonalen Umlagerungen vorhanden. Mit der Analyse fortfahren.	Klonale Umlagerungen vorhanden. Assay wiederholen
<b>Positivkontrolle</b> (Dies kann auch eine Extraktionskontrolle sein, wenn Positivkontrollmaterial durch Extraktionsprozesse gewonnen wird)	Die Produktgröße entspricht den erwarteten Werten, die in Abschnitt 10.1 <i>Erwartete Länge der amplifizierten Produkte</i> aufgeführt werden. Mit der Analyse fortfahren.	Assay wiederholen.
<b>Specimen Control Size Ladder (Probenkontroll-Größenleiter)</b> (Diese Amplifikationskontrolle ist für Proben unbekannter Menge und Qualität <u>unverzichtbar</u> .)	Wenn die Peaks bei 96, 197, 297, 397 und 602 nt 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. Probeninterpretation

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

- Ein oder zwei signifikante positive Banden<sup>a</sup> innerhalb des gültigen Größenbereichs sind wie folgt anzugeben: **„Positiv auf Nachweis von klonalen Genumlagerungen der schweren Immunglobulinketten oder der Immunglobulin-Kappa-Leichtkette in Übereinstimmung mit dem Vorhandensein einer klonalen Zellpopulation. Im Zusammenhang mit allgemeinen diagnostischen Kriterien können klonale Zellpopulationen auf das Vorhandensein einer hämatologischen Malignität hinweisen.“**
- Die Abwesenheit positiver Banden<sup>a</sup> innerhalb des gültigen Größenbereichs ist wie folgt anzugeben: **„Negativ auf Nachweis von klonalen Genumlagerungen der schweren Immunglobulinketten oder der Immunglobulin-Kappa-Leichtkette.“**

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

- Produkte aus 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 Banden.
- Produkte aus **Proben, die nach einer anfänglichen Diagnose entnommen wurden** und im gültigen Größenbereich liegen und eine der folgenden Bedingungen erfüllen sind positive Banden:
  - 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. 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 Ihrem vorhandenen Kapillarelektrophorese-Gerät gemessenen Amplikon-Größen können sich je nach Detektionsplattform und Version der verwendeten Analyse-Software um 1 bis 4 Nukleotide (nt) 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-Farbzuzuweisung verwendet wird.

Tabelle 8. Erwartete Größe amplifizierter Produkte

Master-Mix	Ziel	Farbe	Kontroll-DNA	Katalognummer	Produktgröße in nt
<i>IGH</i> Tube A	FR1-J <sub>H</sub>	Blau	<b>gültiger Längenbereich</b> IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0030 Clonal Control DNA IVS-0019 Clonal Control DNA	--- 40920010 40881750 40881090	<b>310–360</b> 310–360 280 <sup>a</sup> , 325 345
<i>IGH</i> Tube B	FR2-J <sub>H</sub>	Blau	<b>gültiger Längenbereich</b> IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0030 Clonal Control DNA IVS-0019 Clonal Control DNA	--- 40920010 40881750 40881090	<b>250–295</b> 250–295 260 285
<i>IGH</i> Tube C	FR3-J <sub>H</sub>	Grün	<b>gültiger Längenbereich</b> IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0030 Clonal Control DNA IVS-0019 Clonal Control DNA	--- 40920010 40881750 40881090	<b>100–170</b> 100–170 --- 145
<i>IGK</i> Tube A	V <sub>K</sub> -J <sub>K</sub>	Blau	<b>gültiger Längenbereich</b> IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880370	<b>120–160, 190–210, 260–300</b> 135–155 143
<i>IGK</i> Tube B	V <sub>K</sub> -K <sub>de</sub> + Intron-K <sub>de</sub>	Blau	<b>gültiger Längenbereich</b> IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0007 Clonal Control DNA	--- 40920010 40880370	<b>210–250, 270–300, 350–390</b> 225–245, 265–285, 404 <sup>b,c</sup> 274, 282
Specimen Control Size Ladder	Mehrere Gene	Blau	<b>gültiger Längenbereich</b> IVS-0000 Polyclonal Control DNA	--- 40920010	<b>96, 197, 297, 397, 602<sup>d</sup></b> 96, 197, 297, 397, 602 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Hinweis: Es kann auch eine Bande bei 280 nt auftreten. Diese ist auf ein bekanntes Amplikon zurückzuführen, das knapp außerhalb des gültigen Größenbereichs für *IGH* Tube A (*IGH*-Röhrchen A) liegt.

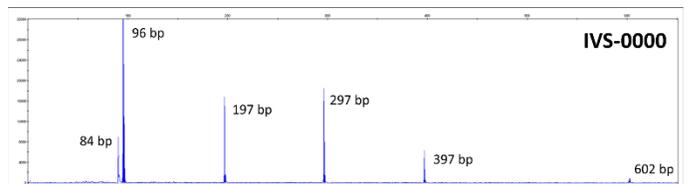
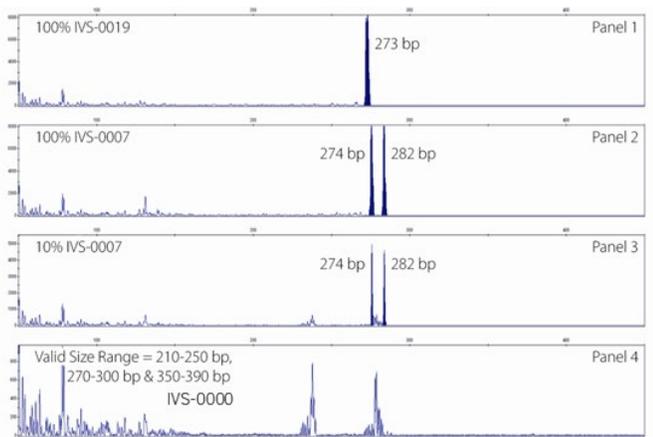
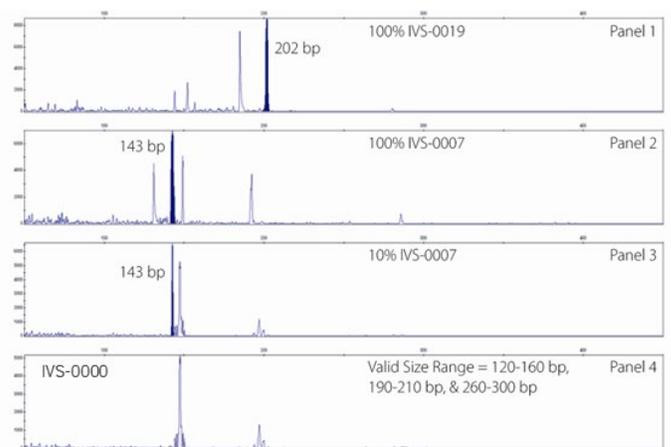
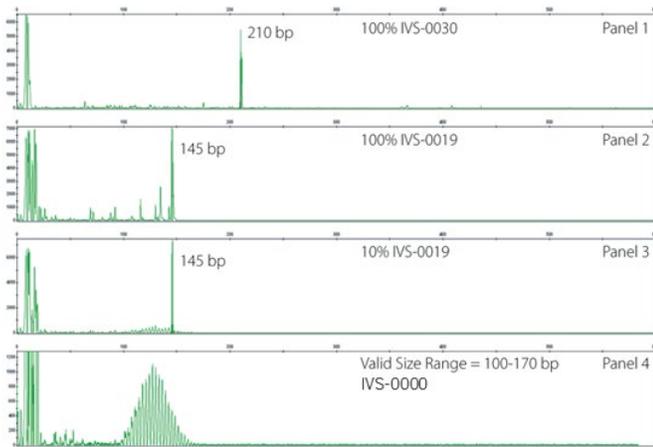
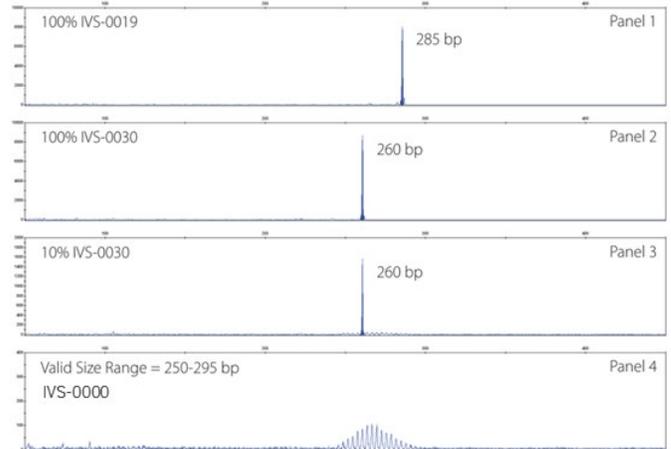
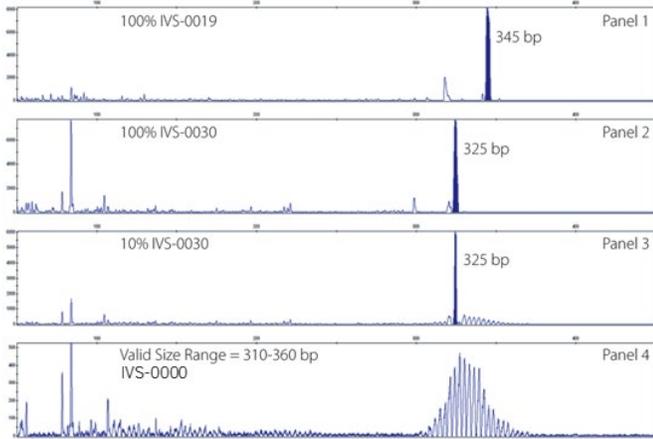
<sup>b</sup>Hinweis: Die Normalverteilung für *IGK*-Genumlagerungen ist durch die begrenzte junktionale Diversität stark gekürzt. Eine detaillierte Erklärung findet sich in der Veröffentlichung von Rock *et al.*<sup>5</sup>

<sup>c</sup>Hinweis: Unter suboptimalen Bedingungen kann ein nicht-spezifisches Produkt von 404 nt in Röhrchen B nachgewiesen werden. Um zwischen spezifischen und nicht-spezifischen Produkten zu unterscheiden, sollte eine Negativ-Kontroll-DNA diese Bande nicht innerhalb des gleichen Experiments aufweisen. Wenn eine Bande vorhanden ist, gilt sie als nicht-spezifisch.

<sup>d</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.

10.2. Beispieldaten

Die unten aufgeführten Daten wurden mit den angegebenen Master-Mixen erhalten. Die amplifizierten Produkte wurden mit einem ABI-Instrument analysiert.



## 11. Leistungseigenschaften

Dieser IdentiClone *IGH + IGK* B-Cell 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.<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 sieben 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 Genuklagerungen für den Nachweis einer minimalen Resterkrankung 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.
5. Rock, EP, Sibbald, PR, Davis, MM, Chein, YH. (1994). CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J. Exp. Med.*, 179, 323-328.

## 13. Technischer Support und Kundendienst

Vertreter des technischen Support 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](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 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. 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 Anmeldungen 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.