

Gebrauchsanleitung

C € K IVD

IdentiClone® TCRB + TCRG T-cell Clonality Assay

Zur Identifizierung von klonalen Genumlagerungen der T-Zell-Rezeptor-Beta-Kette und -Gamma-Kette.

In-vitro-Diagnostikum





Lagerungsbedingungen: -85ºC bis -65ºC

(Die DNA-Kontrollen können separat von den Assay-Kits bei 2°C bis 8°C gelagert werden)

Inhaltsverzeichnis

1.	BESTIMMUNGSGEMÄßE VERWENDUNG						
2.	ZUSA	MMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS	3				
	2.1.	Hintergrund	3				
	2.2.	Zusammenfassung	3				
3.	VERF	FAHRENSPRINZIP	4				
	3.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	4				
	3.2.	Nachweis mittels differentieller Fluoreszenz	4				
4.	REAG	GENZIEN	5				
	4.1.	Bestandteile der Reagenzien	5				
	4.2.	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	6				
	4.3.	Lagerung und Handhabung	6				
5.	Insti	RUMENTE	7				
	5.1.	Thermocycler	7				
	5.2.	ABI-Kapillar elektrophorese-Instrumente	7				
6.	Prof	BENENTNAHME UND -VORBEREITUNG	8				
	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				
7.	Assay-Verfahren						
	7.1.	Im Lieferumfang enthaltene Materialien					
	7.2.	Erforderliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)					
	7.3.	Vorbereitung der Reagenzien					
	7.4.	Amplifikation	11				
	7.5.	ABI-Fluoreszenz detektion					
	7.6.	Qualitätskontrolle					
	7.7.	Empfohlene Positivkontrollen	12				
8.	Ausv	WERTUNG DER ERGEBNISSE	13				
	8.1.	Analyse	13				
	8.2.	Interpretation der Proben	14				
9.	Anw	ENDUNGSGRENZEN DES VERFAHRENS	14				
10.	Erw	ARTUNGSWERTE	14				
	10.1.	Erwartete Größe amplifizierter Produkte					
	10.2.	Probendaten	15				
11.	LEIST	TUNGSEIGENSCHAFTEN	16				
12.	2. Technischer Kundendienst						
13.	3. Referenzen						
14.	Syme	BOLE	17				
15.	RECH	HTLICHE HINWEISE	18				
	15.1.	Gewährleistung und Haftung	18				
	15.2.	Patente und Marken					

1. Bestimmungsgemäße Verwendung

Der IdentiClone *TCRB* + *TCRG* T-cell Clonality Assay ist ein *In-vitro*-Diagnostikum für die PCR-basierte Detektion klonaler Genumlagerungen der T-Zell-Rezeptor-Beta-Kette und -Gamma-Kette bei Patienten, bei denen Lymphproliferationen vermutet werden. Insbesondere kann der *TCRB* + *TCRG* T-cell Clonality Assay für folgende Zwecke verwendet werden:

- Identifizierung von Klonalität in verdächtigen Lymphoproliferationen
- Unterstützung einer Differentialdiagnose zwischen reaktiven Läsionen und T-Zellen und einigen unreifen B-Zell-Malignitäten
- Bestimmung der vermutlichen Abstammungslinie in reifen lymphoproliferativen Erkrankungen
- Überwachung und Beurteilung von Krankheitsrückfällen

2. Zusammenfassung und Erläuterung des Tests

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.¹ Dieser IdentiClone PCR-Assay verwendet mehrere Konsensus-DNA-Primer, die an die konservierten Genregionen in den T-Zell-Rezeptor-Beta-Ketten- und Gamma-Ketten-Genen binden. Dieser Assay wird für den Nachweis der überwiegenden Mehrheit klonaler T-Zell-Malignitäten aus der DNA verwendet. Die Assayprodukte können mithilfe einer Reihe von Detektionsmethoden, einschließlich Gel- und Kapillarelektrophorese, analysiert werden.

Die Genumlagerungsanalyse kann auch mit Southern-Blot (SB)-basierten Techniken durchgeführt werden. Obwohl SB-Analysen sehr zuverlässig sind, werden sie aufgrund der größeren Effizienz und Empfindlichkeit der PCR-Techniken zunehmend durch diese ersetzt. Außerdem ist PCR im Vergleich zu SB relativ leicht durchzuführen, weniger arbeitsintensiv und erfordert deutlich geringere Mengen an DNA mit hohem Molekulargewicht. PCR kann zudem oft mit DNA durchgeführt werden, die aus paraffin-eingebetteten Gewebeproben isoliert wurde, während kein SB durchgeführt werden kann, da die DNA oft abgebaut ist. Es besteht daher großer Bedarf danach, SB-Analysen durch zuverlässige PCR-Techniken zu ersetzen.

2.2. Zusammenfassung

IdentiClone-Assays von Invivoscribe bieten einen neuen Ansatz für PCR-basierte Klonalitätsassays. Diese Standardassays werden sorgfältig unter Testen positiver und negativer Kontrollproben mit Multiplex-Master-Mixen optimiert. Nach der Entwicklung des Assays wurde dieser ausgiebig validiert, einschließlich durch Testen von mehr als 400 klinischen Proben mithilfe der REAL-Klassifizierung (Revised European/American Lymphoma). Die Tests wurden in einer Kooperationsstudie mit dem Namen BIOMED-2 Concerted Action an mehr als dreißig bekannten unabhängigen Testzentren in Europa durchgeführt. Die Ergebnisse dieser BIOMED-2 Studie sind in *Leukemia*, einer führenden Peer-Review-Zeitschrift, veröffentlicht². In einem 2007 in Leukemia veröffentlichten Artikel wird beschrieben, dass ein Test auf *TCRB*- und *TCRG*-Genumlagerungen zu 94 % Empfindlichkeit führte, im Vergleich zu 91 % für *TCRB* und 89 % für *TCRG* bei getrennter Durchführung der Tests. Auch die Verlässlichkeit des Tests wird möglicherweise erhöht, da es wahrscheinlicher ist, dass klonale Produkte in mehr als einem Röhrchen nachgewiesen werden.⁴

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.

Das Assaykit umfasst 6 Master-Mixe. *TCRB* Tube A und B (*TCRB*-Röhrchen A und B) haben die Rahmenregionen innerhalb der variablen Region und die J- (joining) Region des *TCR*-Beta-Ketten-Locus zum Ziel. *TCRB* Tube C (*TCRB*-Röhrchen C) hat die D- (diversity) und J-Regionen des *TCR*-Beta-Ketten-Locus zum Ziel. *TCRG* Tube A (*TCRG*-Röhrchen A) enthält Primer, die die Vγ1–8- + Vγ10-Gene und Jγ1.1-, Jγ1.3-, Jγ2.1- und Jγ2.3-Gene (jeweils auch als JγP1, Jγ1, JγP2 und Jγ2 bezeichnet) zum Ziel haben. *TCRG* Tube B (*TCRG*-Röhrchen B) enthält Primer, die die Vγ9- + Vγ11-Gene und Jγ1.1-, Jγ1.3-, Jγ2.1- und Jγ2.3-Gene zum Ziel haben. 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, 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. Verfahrensprinzip

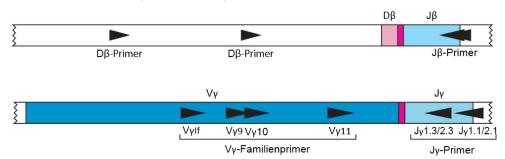
3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Assays werden routinemäßig zur Identifizierung klonaler T-Zell-Populationen verwendet. Diese Assays amplifizieren die DNA zwischen Primern, die die konservierten variablen (V) Regionen und die konservierten J- (joining) Regionen (*TCRB* Tube A und B (*TCRB*-Röhrchen A und B) und *TCRG* Tube A und B (*TCRG*-Röhrchen A und B)) sowie die D- (diversity) und J-Regionen (*TCRB* Tube C (*TCRB*-Röhrchen C)) 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 Genumlagerungen 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.



TCRB-Röhrchen A: 23 Vβ-Primer + 6 Jβ1-Primer und 3 Jβ2-Primer

TCRB-Röhrchen B: 23 V β -Primer + 4 J β 2-Primer TCRB-Röhrchen C: 2 D β -Primer + 13 J β -Primer



TCRG-Röhrchen A: Vylf- und Vy10-Primer + Jy1.1/2.1 und Jy 1.3/2.3 TCRG-Röhrchen B: Vy9- und Vy11-Primer + Jy1.1/2.1 und Jy 1.3/2.3

Abbildung 1. Dies ist eine vereinfachte Darstellung eines repräsentativen umgelagerten T-Zell-Rezeptor-Beta Gens und des T-Zell-Rezeptor-Gamma-Gens, die die ungefähre Platzierung der Upstream- und Downstream-DNA-Primer zeigt. Die Anzahl der Primer und ihre Spezifizität sind für den Master-Mix von *TCRB*-Röhrchen A, B und C und *TCRG*-Röhrchen A und B aufgelistet. (Der Vγ1f-Primer ist ein Konsensus-Primer, der Vγ1 bis Vγ8) zum Ziel hat.

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.

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 bei der Größenbestimmung mithilfe von Kapillarelektrophorese liegt bei etwa 1 bis 2 Basenpaaren. Diese Reproduzierbarkeit und Sensitivität in Kombination mit der automatischen Archivierung der Probendaten ermöglicht eine Überwachung, Verfolgung und den Vergleich von Patientendaten im Zeitverlauf.

4. Reagenzien

4.1. Bestandteile der Reagenzien

Tabelle 1. Verfügbare Kits

	Bestellnr.	Produkt	Menge
REF	92000011	IdentiClone TCRB + TCRG Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Reaktionen
REF	92000021	IdentiClone TCRB + TCRG Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Reaktionen

Tabelle 2. Bestandteile der Reagenzien

Reagenz	Bestellnr.	Bestandteile der Reagenzien (Wirkstoffe)	Stückzahl	92000011 Stückzahl	92000021 Stückzahl	Lager- temperatur	
	22050011CE	TCRB Tube A – 6FAM und HEX Mehrere Oligonukleotide, die an die Vβ- + Jβ1- + Jβ2-Regionen des T-Zell-Rezeptor-Beta-Gens binden, in gepufferter Salzlösung.	1.500 μΙ	1	10		
	22050021CE	TCRB Tube B – 6FAM Mehrere Oligonukleotide, die an die Vβ- + Jβ2- Regionen des T-Zell-Rezeptor-Beta-Gens binden, in gepufferter Salzlösung.	1.500 μΙ	1	10		
Master-Mixe	22050031CE	TCRB Tube C – 6FAM und HEX Mehrere Oligonukleotide, die an die Dβ- + Jβ1- + Jβ2-Regionen des T-Zell-Rezeptor-Beta-Gens binden, in gepufferter Salzlösung.	1.500 μΙ	1	10	-65 °C	
	22070031CE 22070041CE	TCRGTube A – 6FAM und HEX Mehrere Oligonukleotide, die an die Vγ1–8-, Vγ10 + mehrere Jγ-Regionen des T-Zell-Rezeptor- Gamma-Gens binden, in gepufferter Salzlösung.	1.500 μΙ	1	10	-85 °C"	
		TCRGTube B – 6FAM und HEX Mehrere Oligonukleotide, die an die Vγ9- + Vγ11- + mehrere Jγ-Regionen des T-Zell-Rezeptor- Gamma-Gens binden, in gepufferter Salzlösung.	1.500 μΙ	1	10		
Master-Mix für die Amplifikationskontrolle	20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM Mehrere Oligonukleotide, die an Housekeeping- Gene binden.	1.500 μΙ	1	10		
	40881210	IVS-0021 Clonal Control DNA 200 µg/ml DNA in 1/10-TE-Lösung	100 μΙ	1	5		
Positiv-Kontroll-DNA	40880490	IVS-0009 Clonal Control DNA 200 µg/ml DNA in 1/10-TE-Lösung	100 μΙ	1	5	2 °C	
	40880190	IVS-0004 Clonal Control DNA 200 µg/ml DNA in 1/10-TE-Lösung	100 μΙ	1	5	oder	
Negativ (Normal)- Kontroll-DNA	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA 200 µg/ml DNA in 1/10-TE-Lösung	100 μΙ	1	5	-85 °C∕ 1	

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

4.2. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Dieses Produkt ist zur Verwendung in der *In-vitro*-Diagnostik bestimmt.
- Verwenden Sie das 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 Assay-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. Stellen Sie sicher, dass das richtige Programm für den Thermocycler ausgewählt wird, da ungeeignete Programme zu ungenauen/falschen Ergebnissen führen können, wie z. B. falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse.
- Keine Reagenzien aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern mischen oder kombinieren.
- Das Laborpersonal sollte darauf achten, bei der Arbeit mit Proben geeignete persönliche Schutzausrüstung zu tragen, sich an die Richtlinien der guten Laborpraxis zu halten und die allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen anzuwenden. Handhaben Sie Proben in entsprechend zugelassenen Einrichtungen mit biologischer Schutzstufe und öffnen Sie Proben ausschließlich in zertifizierten biologischen Sicherheitswerkbänken. Bei der Aufarbeitung von DNA-Proben ist Wasser in Molekularbiologie-Qualität zu verwenden.
- Aufgrund der analytischen Sensitivität dieses Tests ist die Kontamination der Reagenzien oder Amplifikationsmixe 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 unidirektional zwischen den verschiedenen Bereichen und räumlich getrennt ablaufen: Beginnen Sie mit der Vorbereitung des Master-Mixes, fahren Sie anschließend mit der Probenaufbereitung, dann der Amplifikation, und abschließend der Detektion fort. Amplifizierte DNA sollte nicht in den Bereich gebracht werden, der für die Master-Mix- oder Proben-Vorbereitung vorgesehen ist.
- Alle in einem bestimmten Laborbereich verwendeten Pipetten, Pipettenspitzen und andere 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 Röhrchen mit Schraubverschluss mit O-Ring aliquotieren, falls relevant.

5. Instrumente

5.1. Thermocycler

- Verwendung oder Funktion: Amplifikation von DNA-Proben
- Empfohlenes Instrument: Veriti[™] Thermal Cycler oder ein vergleichbares Gerät
- Leistungseigenschaften und Spezifikation:
 - o Mindest-Temperaturbereich: 15°C bis 96°C
 - Mindestgeschwindigkeit der Temperaturerhöhung: 0,8°C/Sek.
- 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:
 - o Die folgenden Kapillarelektrophorese-Instrumente erfüllen die Leistungsanforderungen dieses Assays:
 - ABI 310 Genetic Analyzer (1-capillary) (ABI 310 Genanalysator (1 Kapillare))
 - ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (4-capillaries) (ABI 3100 Avant-Genanalysator (4 Kapillaren))
 - ABI 3100 Genetic Analyzer (16-capillaries) (ABI 3100 Genanalysator (16 Kapillaren))
 - ABI 3130 Genetic Analyzer (4-capillaries) (ABI 3130 Genanalysator (4 Kapillaren))
 - ABI 3130xL Genetic Analyzer (16-capillaries) (ABI 3130xL Genanalysator (16 Kapillaren))
 - ABI 3500 Genetic Analyzer (8-capillaries) (ABI 3500 Genanalysator (8 Kapillaren))
 - ABI 3500xL Genetic Analyzer (24-capillaries) (ABI 3500xL 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 Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten) kalibriert werden.
- Verwenden Sie die Standardeinstellungen für Ihr Polymer und Ihren Kapillartyp.
- Siehe 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. Im Lieferumfang enthaltene Materialien

	Bestellnr.	Beschreibung
REF	22050011CE	TCRB Tube A – 6FAM und HEX
REF	22050021CE	TCRB Tube B – 6FAM
REF	22050031CE	TCRB Tube C – 6FAM und HEX
REF	22070031CE	TCRG Tube A – 6FAM und HEX
REF	22070041CE	TCRG Tube B – 6FAM und HEX
REF	20960021	Specimen Control Size Ladder – 6FAM
REF	40881210	IVS-0021 Clonal Control DNA
REF	40880490	IVS-0009 Clonal Control DNA
REF	40880190	IVS-0004 Clonal Control DNA
REF	40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA

7.2. Erforderliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)

Tabelle 4. Erforderliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)

Reagenz/Material	Empfohlene Reagenzien/Materialien und Anbieter	Bestellnr.	Anmerkungen
DNA-Polymerase	Roche: • EagleTaq DNA Polymerase Invivoscribe: • FalconTaq DNA Polymerase oder gleichwertige Polymerase	05206944190 60970130	k. A.
Glasdestilliertes, deionisiertes und für die Molekularbiologie geeignetes Wasser oder hochreines Wasser	k. A.	k. A.	frei von DNase/RNase
Kalibrierte Pipetten	Rainin: P-2-, P-20-, P-200- und P-1000-Pipetten Oder SL-2-, SL-20-, und SL-1000-Pipetten	k. A.	Muss für die genaue Messung von Volumina zwischen 1 μl und 1000 μl geeignet sein.
Thermocycler	Thermo Fisher Scientific: Veriti Dx Thermal Cycler Bio-Rad: MJ Research PTC-100 oder PTC-200, PTC-220, PTC-240 Perkin-Elmer PE 9600 oder PE 9700	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-Kapillar elektrophorese- Instrument	Thermo Fisher Scientific: • ABI 310-, 3100- oder 3500-Serie	k. A.	k. A.
Hi-Di Formamid	Thermo Fisher Scientific: • Hi-Di™ Formamide	4311320	k. A.
Größenstandards	Invivoscribe: • Hi-Di Formamide mit ROX-Größenstandards für ABI 3100 Thermo Fisher Scientific: • Für Instrumente der Serie ABI 3100 oder 3130: • GeneScan™ – 400HD [ROX]™ • Für Instrumente der Serie ABI 3500: • GeneScan – 600 [LIZ]™ v2.0	60980061 402985 4408399	k. A.

Tabelle 4. Erforderliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)

Reagenz/Material	Reagenz/Material Empfohlene Reagenzien/Materialien und Anbieter		Anmerkungen
Farbstoffsets zur Spektralkalibrierung	 NED Matrix Standard und Fluorescent Amidite Matrix Standards [6FAM, TET, HEX, TAMRA, ROX] 		k. A.
	 Für Instrumente der Serie ABI 3500: DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5) 	4345833	
Polymer	Thermo Fisher Scientific: • POP-4™ Polymer: • POP-4 für 310 Genetic Analyzers • POP-4 für 3100/3100-Avant Genetic Analyzers • POP-4 für 3130/3130xL Genetic Analyzers • POP-7™ Polymer: • POP-7 für 3130/3130xL Genetic Analyzers • POP-7 für 3500/3500xL Genetic Analyzers	402838 4316355 4352755 4352759 4393714	k. A.
Puffer	Thermo Fisher Scientific: • 10X Puffer für Genanalysatoren mit EDTA	402824	Vor dem Gebrach mit sterilem Wasser auf 1:10 verdünnen.

7.3. Vorbereitung der Reagenzien

- Alle unbekannten Proben mit dem Specimen Control Size Ladder-Master-Mix testen. 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 empfehlen wir Assays in **Duplikaten**, 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.
- Es wird empfohlen, mehrere Proben in einem Durchlauf zu messen, 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.
 - 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:

n = 2 × Anzahl an Proben	(jede Probe im Duplikat durchführen)
+1	Positiv-Kontroll-DNA (siehe Tabelle 6)
+1	Negativ-Kontroll-DNA (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+1	Nicht-Template-Kontrolle (Wasser)
+1	zum Ausgleich von Pipettierfehlern
n = 2 × Anzahl an Proben + 4	Insgesamt

- Daher beträgt das Aliquot-Gesamtvolumen für jeden Master-Mix $\mathbf{n} \times \mathbf{45}$ μl.
- Der Specimen Control Size Ladder-Master-Mix hat die folgende Anzahl an Reaktionen (m):

m = Anzahl an Proben + 3	Insgesamt
+1	zum Ausgleich von Pipettierfehlern
+1	Nicht-Template-Kontrolle (Wasser)
+1	Negativ-Kontroll-DNA (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
m = Anzahl an Proben	(jede Probe einzeln durchführen)

■ Daher beträgt das Aliquot-Gesamtvolumen für den Specimen Control Size Ladder-Master-Mix **m × 45 μ**l.

- 7.3.3. **Für** *TCRB* **Tubes A und B:** Pro Reaktion zu jedem Master-Mix 2,25 Einheiten (oder 0,45 μl bei 5 Einheiten/μl) an Tag-DNA-Polymerase pipettieren.
 - Das Gesamtvolumen der zu jedem Master-Mix hinzugefügten Taq-DNA-Polymerase beträgt n × 0,45 μl.
 - Zum Vermischen behutsam vortexen.
- 7.3.4. **Für** *TCRB* **Tube C und** *TCRG* **Tubes A und B und Specimen Control Size Ladder:** Pro Reaktion zu jeder Taq-DNA-Polymerase 1,25 Einheiten (oder 0,25 µl bei 5 Einheiten/µl) pipettieren.
 - Das Gesamtvolumen der zu jedem Master-Mix hinzugegebenen Taq-DNA-Polymerase beträgt **n × 0,25 μl** für den *TCRB* Tube C Master-Mix und **m × 0,25 ll** für den Master-Mix der Specimen Control Size Ladder.
 - Zum Vermischen behutsam vortexen.
- 7.3.5. Für jede Reaktion 45 µl der geeigneten Lösung aus Master-Mix + DNA-Polymerase in einzelne Wells in einer PCR-Platte oder ein Reaktionsgefäß aliquotieren.
- 7.3.6. $5 \mu l$ 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.
- 7.3.7. 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:

 $\mathbf{n} \times \mathbf{45} \, \mu \mathbf{l}$ Master-Mix

 $n \times 0.25 \mu l$ oder 0.45 μl^* Taq-DNA-Polymerase

Zum Vermischen behutsam vortexen.

Aliquotieren Sie 45 μl des Master-Mixes + Taq-DNA-Polymerase-Lösung in jedes Well.

Fügen Sie **5 μl** des entsprechenden Templates zu jedem Well hinzu.

Gesamt-Reaktionsmenge =

*Hinweis:

Verwenden Sie **0,45 μl** Taq-DNA-Polymerase für *TCRB* Tubes A und B und **0,25 μl** Taq-DNA-Polymerase für *TCRB* Tube C und die Specimen Control Size Ladder.

7.4. Amplifikation

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

50 µl

Tabelle 5. Programmierung des Thermocyclers

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen	
1	95 °C	7 Minuten	1	
2	95 °C	45 Sekunden		
3	60 °C	45 Sekunden	35	
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 Specimen Control Size Ladder-Master-Mix, bei dem vor dem bei 96 Basenpaaren auftretenden Peak ein vorangehender Peak bei 84 Basenpaaren erscheint.

 Keine PCR-Produkte aus verschiedenen Master-Mixen zusammen multiplexen, 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 Reaktion) an Hi-Di Formamid mit ROX-Größenstandards mischen. Gut vortexen.
- 7.5.2. In einer neuen 96-Well-PCR-Platte 10 µl Hi-Di Formamid mit ROX-Größenstandards in je einen Well für jede PCR geben.
- 7.5.3. 1 µl jeder Reaktion in einen Well mit Hi-Di Formamide mit ROX-Größenstandards übertragen. In jedes Well nur eine 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 Reaktion) an Hi-Di Formamid mit LIZ-Größenstandards mischen. Gut vortexen.
- 7.5.10. In einer neuen 96-Well PCR-Platte 9,5 μl an Hi-Di-Formamid mit LIZ-Größenstandards in je ein Well für jede PCR-Reaktion geben.
- 7.5.11. 0,5 µl jeder PCR-Reaktion in das Well mit Hi-Di Formamid mit LIZ-Größenstandards übertragen. In jedes Well nur eine 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-Kapillarelektrophorese-Gerät gemäß dem Benutzerhandbuch vermessen.
- 7.5.16. Die Daten werden automatisch als größen- und farbspezifische Peaks angezeigt. Prüfen Sie Profil und Kontrollen und berichten Sie die Ergebnisse. (Siehe Abschnitte 8 *Auswertung der Ergebnisse* und 10 *Erwartungswerte*)

7.6. Qualitätskontrolle

Positiv- und Negativkontrolle (oder Normalkontrolle) werden im Kit mitgeliefert und in einfacher Ausführung bei jeder Durchführung des Assays durchgeführt, um die Leistung des Assays sicherzustellen. Zusätzlich wird auch eine Nicht-Template-Kontrolle (z. B. Wasser) durchgeführt, um auf Kontaminationen des Master-Mixes 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 aufgeführten Amplikongrößen wurden mithilfe einer ABI-Plattform bestimmt. Die mit Ihrem Kapillar-Elektrophorese-Instrument gemessenen Amplikongrößen können sich je nach Detektionsplattform und Version der verwendeten Analyse-Software um 1 bis 4 Basenpaare (bp) von den aufgelisteten Größen unterscheiden. 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: Die "Farbe" gibt die Farbe der mit dem Master-Mix generierten Produkte an, wenn auf ABI-Fluoreszenzdetektionssystemen die Standard-Farbzuweisung verwendet wird. Die aufgeführten Amplikongrößen wurden mithilfe einer ABI-Plattform bestimmt.

Tabelle 6. Empfohlene Positivkontrollen

Master-Mix	Ziel	Farbe	Kontroll-DNA	Bestellnr.	Produktgröße (bp)
<i>TCRB</i> Tube A	Vβ + Jβ1/2	Blau (Jβ2.X) + Grün (Jβ1.X)	Gültiger Größenbereich IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	240–285 264
<i>TCRB</i> Tube B	Vβ + Jβ2	Blau (Jβ2.X)	Gültiger Größenbereich IVS-0004 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	40880190 40881210	240–285 253 267
<i>TCRB</i> Tube C	Dβ + Jβ1/2	Blau (Jβ2.X) + Grün (Jβ1.X)	Gültiger Größenbereich IVS-0009 Clonal Control DNA	40880490	170–210 (Dβ2), 285–325 (Dβ1) 309
<i>TCRG</i> Tube A	Vγ1–8- + Vγ10- + mehrere Jγ- Regionen	Blau (Jy 1.1/2.1) + Grün (Jγ 1.3/2.3)	Gültiger Größenbereich IVS-0021 Clonal Control DNA	40881210	145–255 211 (Vγ1-8 + Jγ1.3/2.3)
<i>TCRG</i> Tube B	Vγ9- + Vγ11- + mehrere Jγ- Regionen	Blau (Jγ 1.1/2.1) + Grün (Jγ 1.3/2.3)	Gültiger Größenbereich IVS-0021 Clonal Control DNA	 40881210	80–220 167 (Vγ9 + Jγ1.3/2.3)
Specimen Control Size Ladder	Mehrere Gene	Blau	Gültiger Größenbereich IVS-0000 Polyclonal Control DNA	 40920010	96, 197, 297, 397, 602 ° 96, 197, 297, 397, 602°

^aHinweis:

Da kleinere PCR-Fragmente bevorzugt amplifiziert werden, ist es nicht ungewöhnlich, dass das 602-bp-Fragment ein weniger starkes Signal aufweist oder ganz fehlt.

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. Proben mit negativem Ergebnis sind zu wiederholen, wenn die positive Kontrollreaktion fehlschlägt.
- 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. Sämtliche Assay-Kontrollen müssen vor der Bewertung der Analyseergebnisse untersucht 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	
Nicht-Template-Kontrolle	Keine Amplifikation vorhanden: mit der Analyse fortfahren.	Amplifikation vorhanden. Assay wiederholen.	
Polyklonale Kontrolle	Die Produktgröße entspricht den Erwartungswerten, die in Abschnitt 10.1 <i>Erwartete Größe amplifizierter Produkte</i> aufgeführt werden. Keine klonalen Umlagerungen vorhanden. Mit der Analyse fortfahren.	Klonale Umlagerungen vorhanden. Assay wiederholen.	
Positivkontrolle (Hierbei kann es sich auch um eine Extraktionskontrolle handeln, wenn positives Kontrollmaterial durch Extraktionsprozesse geführt wird)	Die Produktgröße entspricht den Erwartungswerten, die in Abschnitt 10.1 <i>Erwartete Größe amplifizierter Produkte</i> aufgeführt werden. Mit der Analyse fortfahren.	Produkt nicht innerhalb des gültigen Größenbereichs. Assay wiederholen.	
Specimen Control Size Ladder (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-bp-Fragment ein weniger starkes Signal aufweist oder ganz fehlt. Mit der Analyse fortfahren.	Sind keine Banden sichtbar, den Assay wiederholen, <u>soweit die Probe nicht</u> <u>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:

- Eine oder zwei signifikante positive Banden³ innerhalb des gültigen Größenbereichs sind wie folgt anzugeben:
 "Positiv auf Erkennung von klonalen Genumlagerungen der T-Zell-Rezeptor-Beta-Kette oder -Gamma-Kette 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 Banden^a innerhalb des gültigen Größenbereichs ist wie folgt anzugeben: "Negativ auf Erkennung von klonalen Genumlagerungen der T-Zell-Rezeptor-Beta-Kette oder -Gamma-Kette."

^aHinweis: Die Kriterien zur Definition einer positiven Bande 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 der initialen Diagnose entnommen wurden und** innerhalb des gültigen Probenbereichs liegen und entweder: 1) mindestens das Dreifache der Amplitude des drittgrößten Peaks betragen; oder 2) die Amplitude der benachbarten Peaks überschreiten und deren Größe den klonalen Amplikonprodukten entspricht, die zuvor vom selben Patienten mit dem selben Master-Mix generiert wurden, entsprechen einem positiven Peak. Produkte, die aus Proben erzeugt werden, die in den gültigen Größenbereich fallen und ein oder mehrere diskrete Banden produzieren, die sich von verschmiertem Hintergrund abheben, entsprechen einer positiven Bande.

9. Anwendungsgrenzen des Verfahrens

- Dieser Assay kann nicht 100 % der klonalen Zellpopulationen erfassen.
- Dieser Assay kann weniger als 1 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 durch EDTA, Heparin und andere Wirkstoffe beeinflusst.

10. Erwartungswerte

10.1. Erwartete Größe amplifizierter Produkte

Die aufgeführten Amplikongrößen wurden mithilfe einer ABI-Plattform bestimmt. Die mit Ihrem Kapillar-Elektrophorese-Instrument gemessenen Amplikongrößen können sich je nach Detektionsplattform und Version der verwendeten Analyse-Software um 1 bis 4 Basenpaare (bp) von den aufgelisteten Größen unterscheiden. 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:

Die "Farbe" gibt die Farbe der mit dem Master-Mix generierten Produkte an, wenn auf ABI-Fluoreszenzdetektionssystemen die Standard-Farbzuweisung verwendet wird. Die aufgeführten Amplikongrößen wurden mithilfe einer ABI-Plattform bestimmt.

Tabelle 8. Erwartete Größe amplifizierter Produkte

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

Tabelle 8. Erwartete Größe amplifizierter Produkte

Master-Mix	Ziel	Farbe	Kontroll-DNA	Bestellnr.	Produktgröße (bp)
<i>TCRB</i> Tube C	Dβ + Jβ1/2	Blau (Jβ2.X) + Grün (Jβ1.X)	Gültiger Größenbereich IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0009 Clonal Control DNA IVS-0004 Clonal Control DNA	40920010 40880490 40880190	170–210 (Dβ2), 285–325 (Dβ1) 128 ^b , 170–210, 285–325, 337 ^b 309 295
<i>TCRG</i> Tube A	Vγ1–8,- + Vγ10- + mehrere Jγ- Regionen	Blau (Jγ 1.1/2.1) + Grün (Jγ 1.3/2.3)	Gültiger Größenbereich IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0009 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	40920010 40880490 40881210	145–255 230–255 (Vγ1-8 + Jγ 1.1/2.1), 195–230 (Vγ1-8 + Jγ 1.3/2.3), 175–195 (Vγ10 + Jγ 1.1/2.1), 145–175 (Vγ10 + Jγ 1.3/2.3) 212 (Vγ1-8 + Jγ 1.3/2.3) 211 (Vγ1-8 + Jγ 1.3/2.3)
<i>TCRG</i> Tube B	Vγ9- + Vγ11- + mehrere Jγ- Regionen	Blau (Jγ 1.1/2.1) + Grün (Jγ 1.3/2.3)	Gültiger Größenbereich IVS-0000 Polyclonal Control DNA IVS-0009 Clonal Control DNA IVS-0021 Clonal Control DNA	40920010 40880490 40881210	80–220 195–220 (Vγ9 + Jγ 1.1/2.1), 160–195° (Vγ9 + Jγ 1.3/2.3), 110–140 ^d (Vγ11 + Jγ 1.1/2.1), 80–110 ^d (Vγ11 + Jγ 1.3/2.3) 115° (Vγ11 + Jγ 1.3/2.3) 167 (Vγ9 + Jγ1.3/2.3)
Specimen Control Size Ladder	Mehrere Gene	Blau	Gültiger Größenbereich IVS-0000 Polyclonal Control DNA	 40920010	96, 197, 297, 397, 602 ^f 96, 197, 297, 397, 602 ^f

^aHinweis:

chinweis: Da kleinere PCR-Fragmente bevorzugt amplifiziert werden, ist es nicht ungewöhnlich, dass das 602-bp-Fragment ein weniger starkes Signal aufweist oder ganz fehlt.

Da kleinere PCR-Fragmente bevorzugt amplifiziert werden, ist es nicht ungewöhnlich, dass das 602-bp-Fragment ein weniger starkes Signal aufweist oder ganz fehlt.

10.2. Probendaten

Die in Abbildung 2–7 gezeigten Daten wurden mit dem angegebenen Master-Mix erhalten. Die amplifizierten Produkte wurden mit einem ABI-Instrument analysiert.

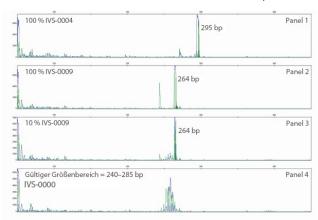


Abbildung 2. TCRB Tube A – 6FAM und HEX

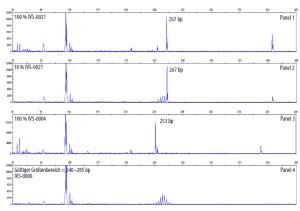


Abbildung 3. TCRB Tube B – 6FAM

Die 271-bp-Bande ist vor allem in Proben mit einer geringen Anzahl an kontaminierenden Lymphoidzellen sichtbar.

bHinweis:

Unter suboptimalen Bedingungen können nicht-spezifische Produkte mit 221 bp (in Tube B) und 128 und 337 bp (in Tube C) erkannt werden. Diese Banden sind, so vorhanden,

dHinweis: In diesem Größenbereich ist oft kein Amplikonprodukt zu sehen. Dies ist ein extrem beschränktes Repertoire.
Hinweis: Dies kann als schwaches Amplikon zu sehen sein.

fHinweis:

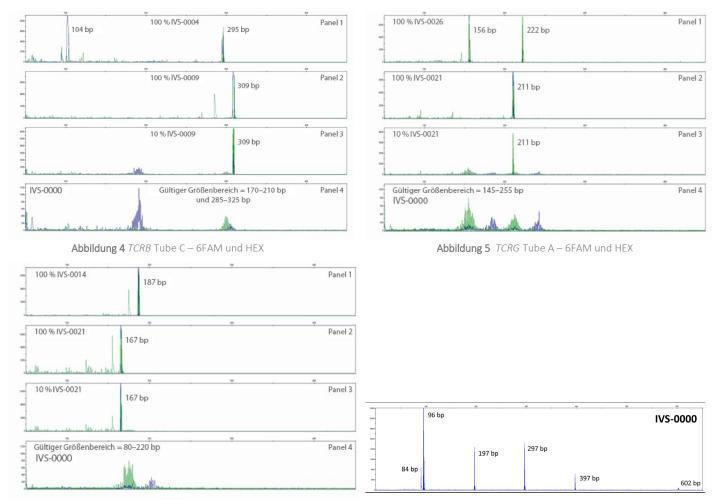


Abbildung 6 TCRG Tube B – 6FAM und HEX

Abbildung 7 Specimen Control Size Ladder – 6FAM Master-Mix

11. Leistungseigenschaften

Der IdentiClone *TCRB* + *TCRG* T-Cell 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 wichtigen Fachartikeln gezeigt; der erste wurde von van Dongen et al. 2003 in *Leukemia* und der zweite von Sandberg *et al.* 2005 im *Journal of Molecular Diagnostics* (JMD) veröffentlicht.

Tabelle 9. Vergleich der Detektion mit PCR und Southern Blot

	PCR/SB-Konkordanz: (<i>Leukemia</i>): ²	PCR,	/SB-Konkordanz (<i>JMD</i>): ³
IGH:	93 % Empfindlichkeit/ 92 % Spezifizität	—	85 % Empfindlichkeit
IGK:	90 % Empfindlichkeit/ 90 % Spezifizität		
IGL:	86 % Empfindlichkeit/ 92 % Spezifizität		
TCRB:	86 % Empfindlichkeit/ 98 % Spezifizität	TCRB:	85 % Empfindlichkeit
TCRG:	89 % Empfindlichkeit/ 94 % Spezifizität		
TCRD:	83 % Empfindlichkeit/ 95 % Spezifizität		

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

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

Die Studie von Sandberg et al. war eine unabhängige Studie an 300 Patientenproben verschiedener Probenarten. 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.³ Ein weiterer Vorteil dieses Assays war, dass die erhaltenen klonalen Ergebnisse den nachfolgenden Nachweis patienten- und tumorspezifischer Genumlagerungen auf minimale Resterkrankungen ermöglichten.

12. 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 | Kundenbetreuung: sales@invivoscribe.com | Webseite: www.invivoscribe.com | Kundenbetreuung: sales@invivoscribe.com | Webseite: www.invivoscribe.com | Webseite: ww

13. Referenzen

- Miller, JE, Wilson, SS, Jaye, DJ, Kronenberg, M. (1999). An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. Molecular Diagnostics
- Van Dongen, JJM et al. (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and Tcell 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.
- van Krieken, JHJM et al. (2007). Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. Leukemia 21, 201-206.

14. Symbole

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

REF	Katalognummer		Verfallsdatum
VOL	Reagenzvolumen	EC REP	Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft
LOT	Chargennummer	$\Box \mathbf{i}$	Gebrauchsanweisung Beachten
1	Lagerbedingungen	IVD	<i>In-vitro-</i> Diagnostikum
UDI	Eindeutige Gerätekennung	***	Hersteller
UK CA	UK-Konformität Geprüft	UKRP	Verantwortliche Person im Vereinigten Königreich
CH REP	Bevollmächtigter Schweizer Vertreter	C€	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 sich 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 definierten und kontrollierten Prozessen festgelegt und kontinuierlich überprüft werden. Hierzu zählt auch, bei jedem Probentest 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 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 Nukleinsäurenamplifikation, wie eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Keine Lizenz unter diesen Patenten, Amplifikationsverfahren oder -enzyme einzusetzen, wird durch den Erwerb dieses Produkts 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.