

Gebrauchsanweisung



## IdentiClone® IGL Gene Clonality Assay

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

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



Lagerbedingungen: **-85°C bis -65°C**

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

Katalognummer	Produkte	Menge
<b>REF</b> 91030011	IdentiClone IGL Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Reaktionen
<b>REF</b> 91030021	IdentiClone IGL Gene 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, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien .....	9
7.3.	Vorbereitung der Reagenzien .....	10
7.4.	Amplifikation .....	11
7.5.	ABI-Fluoreszenzdetektion .....	11
7.6.	Qualitätskontrolle .....	12
7.7.	Empfohlene Positivkontrollen .....	13
<b>8.</b>	<b>INTERPRETATION DER ERGEBNISSE</b> .....	<b>13</b>
8.1.	Analyse .....	13
8.2.	Probeninterpretation .....	14
<b>9.</b>	<b>VERFAHRENSEINSCHRÄNKUNGEN</b> .....	<b>14</b>
<b>10.</b>	<b>ERWARTUNGSWERTE</b> .....	<b>14</b>
10.1.	Erwartete Länge der amplifizierten Produkte .....	14
10.2.	Beispieldaten .....	15
<b>11.</b>	<b>LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN</b> .....	<b>15</b>
<b>12.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>16</b>
<b>13.</b>	<b>TECHNISCHER SUPPORT UND KUNDENDIENST</b> .....	<b>16</b>
<b>14.</b>	<b>SYMBOLE</b> .....	<b>16</b>
<b>15.</b>	<b>HAFTUNGSHINWEIS</b> .....	<b>17</b>
15.1.	Garantie und Haftung .....	17
15.2.	Patente und Marken .....	17

## 1. Verwendungszweck

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

- Erkennung von Klonalität bei atypischen lymphoproliferativen Erkrankungen
- Unterstützung einer Differentialdiagnose zwischen reaktiven Läsionen und hämatologischen Malignitäten
- Zuweisung einer vermutlichen Abstammungslinie bei monoklonalen lymphoproliferativen Erkrankungen ausgereifter Zellen
- Identifizierung tumorspezifischer Marker (*IGL*-Genumlagerungen) für die Nachbehandlungsüberwachung
- Überwachung und Beurteilung von Krankheitsrückfällen

## 2. Zusammenfassung und Erläuterung des Assays

### 2.1. Hintergrund

Rearrangements der Antigenrezeptor-Gene treten während der Ontogenese bei B- und T-Lymphozyten auf. Durch diese Genumlagerungen entstehen 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 Konsensus-DNA-Primer, die an die konservierten Genregionen im Gen für die Immunglobulin-Lambda-Leichtkette 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.<sup>2</sup>

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

### 2.2. Zusammenfassung

Das Assaykit umfasst zwei (2) Master-Mixe. Der *IGL* Tube (IGL-Röhrchen) Master-Mix zielt auf die variablen (V) und verknüpfenden (joining, J) Regionen des Immunglobulin-Lambda-Leichtketten-Locus ab. Der Specimen Control Size Ladder Master Mix (Master-Mix der Probenkontroll-Größenleiter) amplifiziert mehrere Gene und erzeugt eine Reihe von Amplikons von ca. 96, 197, 297, 397 und 602 Basenpaaren (base pair, bp), um sicherzustellen, dass Qualität und Quantität der eingesetzten DNA für den Erhalt eines gültigen Ergebnisses ausreichen. Für alle unsere Gene Clonality Assays werden ein einziges Thermocycler-Programm und eine ähnliche Detektionsmethode verwendet. Dies verbessert die Konsistenz und ermöglicht die Schulung an einem breiten Spektrum von Assays.

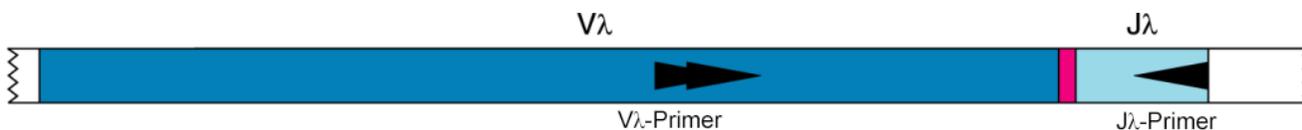
Dieser Assay basiert auf der Euroclonality/BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.



### 3. Verfahrensgrundlagen

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

PCR-Assays werden routinemäßig zur Identifizierung klonaler B-Zell-Populationen verwendet. Diese Assays amplifizieren die DNA zwischen Primern, die das konservierte Gerüst (Framework, FR) der variablen (V) Regionen und die konservierten verknüpfenden (joining, J) Regionen (*IGL Tube* (IGL-Röhrchen) 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 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 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. Auf einem Gel ist die Verteilung der Produkte als verschmierter Bereich zu sehen. Diese Gaußsche Verteilung spiegelt die heterogene Population der V-J-Umlagerungen wider. In bestimmten Fällen, in denen keine Lymphozyten-DNA vorhanden ist, wird kein Produkt festgestellt. DNA aus Proben mit einer klonalen Population liefert ein oder zwei prominente amplifizierte Produkte (Amplikons) in einem verminderten polyklonalen Hintergrund.



#### ***IGL Tube* (IGL-Röhrchen): 2λ V-Primer + 1 Jλ-Primer**

**Abbildung 1.** Dargestellt ist eine einfache Darstellung der Anordnung eines umgelagerten Immunglobulin-Lambda-Leichtketten-Gens auf Chromosom 22q11.2. Schwarze Pfeile zeigen auf die relativen Positionen der Primer. Die beiden Vλ-Primer zielen auf Vλ1, 2 und 3 ab, weil diese drei Familien etwa 70 % der umlagerbaren Vλ-Gensegmente abdecken, und etwa 90 % aller *IGL*-Umlagerungen finden in diesen drei Familien statt. Entsprechend zielt der Jλ-Primer nur auf Jλ1, 2 und 3 ab, weil diese drei Jλ-Gensegmente an 98 % aller *IGL*-Genumlagerungen beteiligt sind.

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 und durchschnittlich große Umlagerung eine Gaußsche Normalverteilung bilden, identifiziert.

#### 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 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 Probanddaten ermöglicht die Überwachung, Nachverfolgung und den Vergleich von Daten einzelner Patienten im Zeitverlauf.

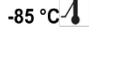
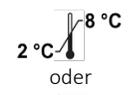
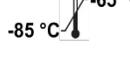
## 4. Reagenzien

### 4.1. Reagenzienbestandteile

Tabelle 1. Verfügbare Kits

Katalognummer	Beschreibung	Menge
<b>REF</b> 91030011	IdentiClone <i>IGL</i> Gene Clonality Assay – ABI Fluorescence Detection	33 Reaktionen
<b>REF</b> 91030021	IdentiClone <i>IGL</i> Gene Clonality Assay MegaKit – ABI Fluorescence Detection	330 Reaktionen

Tabelle 2. Reagenzienbestandteile

Reagenz	Katalognummer	Reagenzienbestandteile (Wirkstoffe)	Mengen-einheit	91030011 Anzahl der Einheiten	91030021 Anzahl der Einheiten	Lagerungs-temp.
<b>Master-Mixe</b>	<b>REF</b> 21030011CE	<b><i>IGL</i> Tube (<i>IGL</i>-Röhrchen) – 6FAM</b> Mehrere Oligonukleotide, die auf die V $\lambda$ -Region und die J $\lambda$ -Region des Gens der Immunglobulin-Lambda-Leichtkette abzielen, in gepufferter Salzlösung.	1500 $\mu$ L	1	10	 -65 °C
<b>Master-Mix für die Template-Amplifikation</b>	<b>REF</b> 20960021	<b>Specimen Control Size Ladder (Probenkontroll-Größenleiter) – 6FAM</b> Mehrere Oligonukleotide, die an Housekeeping-Gene binden.	1500 $\mu$ L	1	10	 -85 °C
<b>Positiv-Kontroll-DNA</b>	<b>REF</b> 40880550	<b>IVS-0010 Clonal Control DNA (klonale Kontroll-DNA)</b> 200 $\mu$ g/mL DNA in 1/10 TE	100 $\mu$ L	1	5	 2 °C oder 8 °C
	<b>REF</b> 40881690	<b>IVS-0029 Clonal Control DNA (klonale Kontroll-DNA)</b> 200 $\mu$ g/mL DNA in 1/10 TE	100 $\mu$ L	1	5	
<b>Negative (normale) Kontroll-DNA</b>	<b>REF</b> 40920010	<b>IVS-0000 Polyclonal Control DNA (polyklonale Kontroll-DNA)</b> 200 $\mu$ g/mL DNA in 1/10 TE	100 $\mu$ L	1	5	 -85 °C

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

#### 4.2. Warn- und Vorsichtshinweise

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

#### 4.3. Lagerung und Handhabung

- Sofern die Assay-Kits nicht sofort verwendet werden, **sind diese bei -85 °C bis -65 °C zu lagern.**
- Die optimale Lagertemperatur für DNA-Kontrollen beträgt 2 °C bis 8 °C, DNA-Kontrollen können jedoch 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
- 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 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-Instrument 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 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)
- 2 µg genomische DNA (gelagert bei 2 °C bis 8 °C und Versand bei Umgebungstemperatur)
- formalinfixierte und paraffin-eingebettete Gewebeproben oder Probenträger (Lagerung und Versand bei Umgebungstemperatur)

### 6.4. Probenvorbereitung

Die 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 (1 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) oder in für die Molekularbiologie geeignetem oder USP-Wasser resuspendieren. Es handelt sich um ein robustes Testsystem. Ein gültiges Ergebnis wird mit einem großen Bereich von DNA-Konzentrationen erzielt. Daher sind im Allgemeinen keine Quantifizierung und Anpassung der DNA-Konzentrationen erforderlich. Durch Testen der Proben-DNA mit dem Specimen Control Size Ladder Master Mix (Master-Mix mit der Probenkontroll-Größenleiter) wird sichergestellt, dass DNA von ausreichender Qualität und Quantität vorhanden war, um ein gültiges Ergebnis zu erzielen.

### 6.5. Probenlagerung

Genomische DNA (gDNA) bei 2 °C bis 8 °C oder für längere Zeiträume bei -85 °C bis -65 °C lagern.

## 7. Assay-Verfahren

### 7.1. Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Tabelle 3: Kit-Bestandteile

Katalognummer	Beschreibung
<b>REF</b> 21030011CE	IGL Tube (IGL-Röhrchen) – 6FAM
<b>REF</b> 20960021	Specimen Control Size Ladder (Probenkontroll-Größenleiter) – 6FAM
<b>REF</b> 40880550	IVS-0010 Clonal Control DNA (klonale Kontroll-DNA)
<b>REF</b> 40881690	IVS-0029 Clonal Control DNA (klonale Kontroll-DNA)
<b>REF</b> 40920010	IVS-0000 Polyclonal Control DNA (polyklonale Kontroll-DNA)

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

Tabelle 4: Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Reagenz/Material	Empfohlene Reagenzien/Materialien und Anbieter	Katalognummer <b>(REF)</b>	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 (DNS-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>MJ Research PTC-100 oder PTC-200, PTC-220, PTC-240</li> </ul> Perkin-Elmer <ul style="list-style-type: none"> <li>PE 9600 oder PE 9700</li> </ul>	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>	S.O.	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, Inc.: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hi-Di Formamide mit ROX-Größenstandards fürABI 3100</li> </ul> Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>für Instrumente der Serie ABI 3100 oder 3130: <ul style="list-style-type: none"> <li>GeneScan™ - 400HD [ROX]™</li> </ul> </li> <li>für Instrumente der Serie ABI 3500: <ul style="list-style-type: none"> <li>GeneScan - 600 [LIZ]™ v2.0</li> </ul> </li> </ul>	60980061  402985  4408399	keine Angabe
<b>Dye Set für spektrale Kalibrierung</b>	Applied Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>für Instrumente der Serie ABI 3100 oder 3130: <ul style="list-style-type: none"> <li>DS-30 Matrix Standard Kit (Dye Set D) (Matrix-Standardkit [Farbstoffset])</li> </ul> </li> </ul>	4345827	keine Angabe

Tabelle 4: Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Reagenz/Material	Empfohlene Reagenzien/Materialien und Anbieter	Katalognummer (REF)	Anmerkungen
Dye Set für spektrale Kalibrierung	<ul style="list-style-type: none"> <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) (DS-33 Matrix-Standardkit [Farbstoffset G5])</li> </ul> </li> </ul>	402996	keine Angabe
		401546	
		4345833	
Polymer	Applied Biosystems:		keine Angabe
	<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		
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 (Master-Mix der Probenkontroll-Größenleiter) 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, jedoch sind Assays in **Duplikaten** durchzuführen, soweit dies möglich ist. 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.

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 Mikrozentrifugegefäße geben.

- Das Volumen der Aliquots 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)
+ 1	Positiv-Kontroll-DNA (Siehe Abschnitt 7.7: <i>Empfohlene Positivkontrollen</i> )
+ 1	Negativ-Kontroll-DNA (IVS-0000 Polyclonal Control DNA)
+ 1	Nicht-Template-Kontrolle (Wasser)
+ 1	zum Ausgleich von Pipettierfehlern

---

**n = 2 × Anzahl an Proben + 4      gesamt**

- Daher sollte das Aliquot-Gesamtvolumen für jeden Master-Mix = **n x 45 µL** betragen.
- Der Specimen Control Size Ladder Master Mix (Master-Mix der Probenkontroll-Größenleiter) 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

---

**m = Anzahl an Proben + 3      gesamt**

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

- 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 zu jedem Master-Mix hinzugegebenen Taq-DNA-Polymerase beträgt =  $n \times 0,25 \mu\text{L}$  und  $m \times 0,25 \mu\text{L}$  für den Specimen Control Size Ladder Master Mix (Master-Mix der Probenkontroll-Größenleiter).
  - 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 in PCR-Röhrchen überführen.
- 7.3.5. 5 µL des entsprechenden Templates (Proben-DNA, Positiv-Kontroll-DNA, Negativ-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 Vorbereitung der Reagenzien durchgeführt werden können.

**Schnellanleitung:**Für jeden Master-Mix und  $n$  Reaktionen Folgendes vermischen: $n \times 45 \mu\text{L}$  Master-Mix $n \times 0,25 \mu\text{L}$  Taq-DNA-Polymerase

Zum Vermischen behutsam vortexen.

45 µL des Master-Mix + DNA-Polymerase-Lösung in jeden Well aliquotieren

5 µL des entsprechenden Templates zu jedem Well hinzufügen

Gesamtreaktionsvolumen = 50 µL

## 7.4. Amplifikation

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

Tabelle 5: Programmierung des Thermocyclers

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

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

## 7.5. ABI-Fluoreszenzdetektion

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 (Master-Mix der Probenkontroll-Größenleiter), bei dem vor dem bei 96 Nukleotiden auftretenden Peak ein vorangehender Peak bei 84 Nukleotiden erscheint.

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

### Plattformen der Serien ABI 310, 3100 ODER 3130:

- 7.5.1. In einem neuen Mikrozentrifugengefäß eine angemessene Menge (für ein Gesamtvolumen von 10 µL pro PCR-Reaktion) an Hi-Di Formamide mit ROX Size Standards mischen. Gut 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 PCR-Reaktion in jedes Well mit Hi-Di-Formamid mit ROX-Größenstandards übertragen.
  - Nur eine Probe pro Well zugeben.
  - Zum Mischen auf- und abpipettieren.
- 7.5.4. Die PCR-Platte oder -Röhrchen verschließen oder abdecken.
- 7.5.5. Die Proben für 2 Minuten bei 95°C hitzedenaturieren, dann für 5 Minuten auf Eis schockkühlen.
- 7.5.6. Für die Proben ein **Probenblatt** und eine **Injektionsliste** erstellen.
- 7.5.7. Die Proben auf einem ABI-Kapillarelektrophorese-Gerät gemäß dem Benutzerhandbuch trennen.
  - 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*.)

### ABI-3500-Plattformen:

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

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

### 7.6. Qualitätskontrolle

Positiv- und Negativkontrolle (oder Normalkontrolle) werden im Kit mitgeliefert und können in einfacher Ausführung bei jeder Durchführung des Assays durchgeführt werden, um die Leistung des Assays sicherzustellen. Zusätzlich sollte außerdem eine Nicht-Template-Kontrolle (z. B. Wasser) durchgeführt werden, um auf Kontaminationen des Master-Mixes oder Kreuzkontamination der Reaktionen aufgrund falscher steriler Arbeitsweise zu prüfen. Es kann auch zusätzlich eine Pufferkontrolle verwendet werden, um sicherzustellen, dass keine Kontamination des Puffers aufgetreten ist, der zum Resuspendieren der Proben verwendet wurde. Die Werte für die Positivkontrollen finden sich in Abschnitt 10.1 *Erwartete Größe amplifizierter Produkte*. Zusätzliche Kontrollen und Sensitivitätskontrollen (Verdünnungen von Positivkontrollen in unserer Negativkontrolle) können bei Invivoscribe bestellt werden.

## 7.7. Empfohlene Positivkontrollen

Die aufgeführten Amplikon-Größen wurden mithilfe einer ABI-Plattform bestimmt. Die mit dem vorhandenen Kapillarelektrophorese-Gerät gemessenen Amplikon-Größen können sich je nach Detektionsplattform und Version der verwendeten Analyse-Software um 1 bis 4 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: Empfohlene Positivkontrollen

Master-Mix	Ziel	Farbe	Kontroll-DNA	Katalog-nummer	Produktgröße in Nukleotiden (nt)
<b>IGL Tube</b>	Vλ -Jλ	Blau	<b>gültiger Längenbereich</b>	---	<b>135–170</b>
			IVS-0010 Clonal Control DNA	40880550	139 <sup>a</sup>
			IVS-0029 Clonal Control DNA	40881690	143 <sup>a</sup> , 156
<b>Specimen Control Size Ladder</b>	mehrere Gene	Blau	<b>gültiger Längenbereich</b>	---	<b>96, 197, 297, 397, 602<sup>b</sup></b>
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	96, 197, 297, 397, 602 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Hinweis: Eventuell ist ein schwacher vorhergehender Peak bei ungefähr 127 nt zu beobachten.

<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. Bei der ABI-Fluoreszenzdetektion wird der 602-nt-Peak bei normalen Durchgangszeiten möglicherweise nicht angezeigt. Darüber hinaus kann die Größe dieses Peaks um über 30 nt abweichen, wenn die Fragmentgröße mit GeneScan - 400HD [ROX]-Größenstandards extrapoliert wird.

## 8. Interpretation der Ergebnisse

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

### 8.1. Analyse

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

Art der Kontrolle	Erwartetes Ergebnis	Aberrantes Ergebnis
<b>No Template Control</b>	Keine Amplifikation vorhanden: mit der Analyse fortfahren	Amplifikation vorhanden, Assay wiederholen.
<b>Polyklonale Kontrolle</b>	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
<b>Positivkontrolle</b> (Dies kann auch eine Extraktionskontrolle sein, wenn Positivkontrollmaterial durch Extraktionsprozesse gewonnen wird.)	Die Produktgröße entspricht den Erwartungswerten, die in Abschnitt 10.1 <i>Erwartete Größe amplifizierter Produkte</i> aufgeführt werden. Mit der Analyse fortfahren.	Assay wiederholen.
<b>Specimen Control Size Ladder</b> (Diese Amplifikationskontrolle ist für Proben unbekannter Menge und Qualität <u>unverzichtbar</u> .)	Wenn die Peaks bei 96, 197, 297, 397 und 602 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, ist die Probe erneut auf DNA-Abbau zu prüfen, <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 Peaks<sup>a</sup> innerhalb des gültigen Größenbereichs sind wie folgt anzugeben:  
„**Positiv auf Nachweis von klonalen Genumlagerungen der Immunglobulin-Lambda-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 Peaks<sup>a</sup> innerhalb des gültigen Größenbereichs ist wie folgt anzugeben:  
„**Negativ auf Nachweis von klonalen Genumlagerungen der Immunglobulin-Lambda-Leichtkette.**“

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

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

## 9. Verfahrenseinschränkungen

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

## 10. Erwartungswerte

### 10.1. Erwartete Länge der amplifizierten Produkte

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

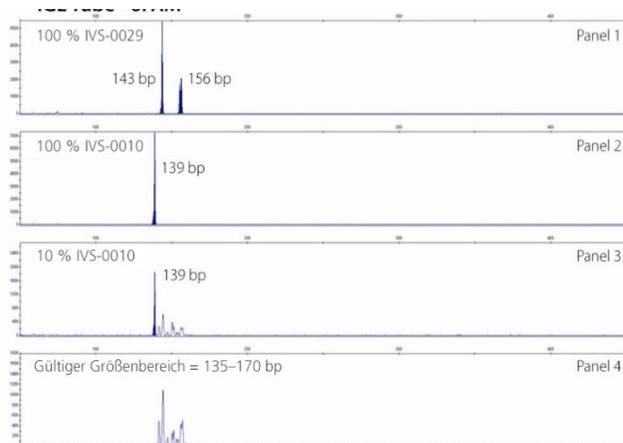
**Tabelle 8:** Erwartete Größe amplifizierter Produkte

Master-Mix	Ziel	Farbe	Kontroll-DNA	Katalog-nummer	Produktgröße in Nukleotiden (nt)
<i>IGL</i> Tube	Vλ -Jλ	Blau	<b>gültiger Längenbereich</b>	---	<b>135–170</b>
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	135–170
			IVS-0010 Clonal Control DNA	40880550	139 <sup>a</sup>
			IVS-0029 Clonal Control DNA	40881690	143 <sup>a</sup> , 156
Specimen Control Size Ladder	Mehrere Gene	Blau	<b>gültiger Längenbereich</b>	---	<b>96, 197, 297, 397, 602<sup>b</sup></b>
			IVS-0000 Polyclonal Control DNA	40920010	96, 197, 297, 397, 602 <sup>b</sup>

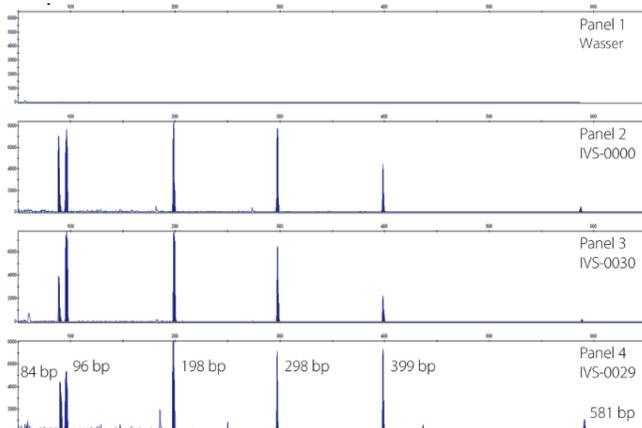
<sup>a</sup>Hinweis: Eventuell ist ein schwacher vorhergehender Peak bei ungefähr 127 nt zu beobachten.

<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. Bei der ABI-Fluoreszenzdetektion wird der 602-nt-Peak bei normalen Durchgangszeiten möglicherweise nicht angezeigt. Darüber hinaus kann die Größe dieses Peaks um über 30 nt abweichen, wenn die Fragmentgröße mit GeneScan - 400HD [ROX]-Größenstandards extrapoliert wird.

## 10.2. Beispieldaten



**Abbildung 2.** Die links aufgeführten Daten wurden mit dem Master-Mix des IGL Tube (IGL-Röhrchen) erhalten.



**Abbildung 3.** Die links gezeigten Daten wurden mithilfe des Specimen Control Size Ladder Master Mix (Master-Mix der Probenkontroll-Größenleiter) generiert.

## 11. Leistungseigenschaften

Der IdentiClone IGL Gene Clonality PCR-Test ist ein schnelles und zuverlässiges Verfahren für den Nachweis von Klonalität bei Verdacht auf Lymphproliferation, das wesentlich empfindlicher ist als das Southern-Blot-Verfahren (SB). Die abschließende klinisch-histopathologische Diagnose stimmt im Vergleich mit SB-Ergebnissen bei einer größeren Zahl an Patienten gut mit den PCR-Ergebnissen überein.<sup>2</sup>

**Tabelle 9.** Konkordanzstudien

PCR/SB-Konkordanz: <sup>2</sup>		PCR/SB-Konkordanz: <sup>3</sup>	
IGH:	93 % Empfindlichkeit/92 % Spezifität	IGH + IGK:	85 % Empfindlichkeit
IGK:	90 % Empfindlichkeit/90 % Spezifität		
IGL:	86 % Empfindlichkeit 92 % Spezifität	TCRB:	85 % Empfindlichkeit
TCRB:	86 % Empfindlichkeit/98 % Spezifität		
TCRG:	89 % Empfindlichkeit/94 % Spezifität		
TCRD:	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:
IGH + IGK:	85 %	98 %	39 %
TCRB:	85 %	96 %	35 %

Die diagnostische Genauigkeit dieses IdentiClone-Tests beträgt mindestens 89 %. Mit den IdentiClone-Assays traten keine eindeutig falsch-positiven Ergebnisse auf und die Präzision war sehr hoch. Ein weiterer Vorteil dieses Assays war, dass die erhaltenen klonalen Ergebnisse den nachfolgenden Nachweis patienten- und tumorspezifischer Genumlagerungen für den Nachweis einer minimalen Resterkrankung ermöglichten.

## 12. Bibliographie

1. Miller, JE, Wilson, SS, Jaye, DJ, Kronenberg, M. An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Mol. Diag.* 1999, **4(2)**:101-117.
2. Van Dongen, JJM *et al.* 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. *33Leukemia*. 2003, **17(12)**:2257-2317.

## 13. Technischer Support und Kundendienst

### 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)

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

## 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		<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Eindeutige Gerätekennung		Hersteller
	UK-Konformität Geprüft		Verantwortliche Person im Vereinigten Königreich
	Bevollmächtigter Schweizer Vertreter		Europäische Konformität

## 15. Haftungshinweis

### 15.1. Garantie und Haftung

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

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

### 15.2. Patente und Marken

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

Identiclone® ist eine eingetragene Handelsmarke von Invivoscribe®.

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