

Gebrauchsanweisung

IdentiClone® Dx

IGH Assay



IVD *In-vitro*-Diagnostikum.

Katalognummer

REF 91010101

Produkt(e)

IdentiClone Dx IGH Assay


UDI

00810022732502

Menge

33 Reaktionen

Lagerbedingungen

-30°C  -15°C

Inhaltsverzeichnis

1.	VERWENDUNGSZWECK	3
2.	INDIKATIONEN/KONTRAINDIKATIONEN	3
3.	GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN	3
3.1.	Glossar.....	3
3.2.	Abkürzungen.....	4
4.	ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES ASSAYS	5
4.1.	Hintergrund.....	5
4.2.	Zusammenfassung.....	5
5.	VERFAHRENSGRUNDLAGEN	6
5.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	6
5.2.	Fluoreszenzdetektion	6
5.3.	Softwareanalyse	6
5.4.	Endnutzer und vorgesehenes Verwendungsumfeld	7
6.	REAGENZIE	7
6.1.	Reagenzienbestandteile.....	7
6.2.	Lagerung und Handhabung von Reagenzien	8
6.3.	Warn- und Vorsichtshinweise.....	8
6.4.	Reagenzien, Materialien und Ausrüstung	9
7.	PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG	11
7.1.	Vorsichtsmaßnahmen	11
7.2.	Störsubstanzen	11
7.3.	Anforderungen und Stabilität von Proben	11
7.4.	Probenvorbereitung	11
7.5.	Probenlagerung	11
8.	ASSAY-VERFAHREN	12
8.1.	Mastermix-Vorbereitung.....	13
8.2.	PCR-Amplifikation	14
8.3.	Detektionsplatte vorbereiten	14
8.4.	Assayparameter installieren	15
8.5.	Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese	18
8.6.	Qualitätskontrolle.....	20
9.	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	21
9.1.	Software-Prüfpunkte	21
10.	ERNEUTE TESTS, FALLS ZUTREFFEND	23
10.1.	Ungültige Durchläufe	23
10.2.	Ungültige Proben in einem gültigen Durchlauf.....	23
10.3.	Fehlerbeschreibungen und Testwiederholung	23
11.	VERFAHRENSEINSCHRÄNKUNGEN	24
12.	LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN	24
12.1.	Proben- und Probenvalidierungen – Stabilität der Proben.....	24
12.2.	Klinischer Grenzwert	25
12.3.	Analytische Empfindlichkeit Leerwertgrenze (Limit of Blank, LoB)	26
12.4.	Analytische Empfindlichkeit Nachweisgrenze (LoD).....	27
12.5.	Analytische Spezifität: Störsubstanzen.....	29
12.6.	Analytische Spezifität: Verschleppung/Kreuzkontamination	30
12.7.	Analytische Spezifität: Laborinterne Präzisionsstudie.....	31
12.8.	Messgenauigkeit: Multizentrische Reproduzierbarkeitsstudie.....	32
12.9.	Validierung des Assay-Arbeitsablaufs: DNA-Extraktionsstudie	33
12.10.	Validierung des Assay-Arbeitsablaufs: DNA-Eingabestudie	35
12.11.	Validierung des Assay-Arbeitsablaufs: Äquivalenz: 3500xL gegenüber 3500xL Dx	36
12.12.	Klinische Validierung	37
13.	REFERENZEN	40
14.	TECHNISCHER SUPPORT UND KUNDENDIENST	40
15.	SYMBOLE	41
16.	HAFTUNGSHINWEIS	41
17.	VERSIONSVORLAUF	41

1. Verwendungszweck

Der IdentiClone Dx *IGH* Assay („Assay“) ist ein *In-vitro*-Diagnostikum, das für den Kapillarelektrophorese-Nachweis der Klonalität in Immunglobulin-Hochketten-Genumanordnungen (*IGH*) in peripheren Blutproben als Zusatzmethode zur Diagnose von Patienten mit Verdacht auf eine lymphoproliferative B-Zell-Erkrankung bestimmt ist.

Positive Ergebnisse (d. h. der Nachweis der Klonalität) sollten nicht das einzige Kriterium zur Bestimmung des Vorliegens einer Erkrankung sein. Negative Ergebnisse schließen eine lymphoproliferative Erkrankung nicht aus. Die Verwendung zusätzlicher Labortests (z. B. Leukozytenzahl [WBC], Morphologie, Immunhistochemie, Nachweis von Treiber Mutationen, Durchflusszytometrie usw.) und das klinische Erscheinungsbild müssen bei der endgültigen Diagnose einer lymphoproliferativen Erkrankung berücksichtigt werden.

Dieser qualitative, nicht automatisierte Assay ist zur Verwendung auf den ABI 3500xL Dx und ABI 3500xL Genetic Analyzers bestimmt.

2. Indikationen/Kontraindikationen

Es wurden keine Kontraindikationen identifiziert.

3. Glossar und Abkürzungen

3.1. Glossar

Tabelle 1. Glossar der für den IdentiClone Dx *IGH* Assay spezifischen Begriffe

Begriff	Definition
Amplikon	Multiplizierte Kopien des DNA-Fragments, das durch Amplifikation erstellt wurde (z. B. PCR).
Amplifikation	Anfertigung mehrerer Kopien eines Gens oder einer DNA-Sequenz (z. B. PCR).
Artefakt	Ein roter Peak, der durch Fragmentanalyse auf dem ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer erkannt wurde und innerhalb von 0,5 Basenpaaren von bis zu 5 höchsten blauen oder grünen Peaks liegt. Wenn die Artefaktspitze den zugehörigen blauen oder grünen Peak erreicht oder überschreitet, wird das zugehörige Mastermix-Ergebnis (MM) als ungültig betrachtet.
Clan	<i>IGH</i> -Genumlagerungen werden mit dem IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay durch die Verwendung von Primern identifiziert, die auf die 7 <i>IGHV</i> -Subgruppengene, <i>IGHV1-7</i> , abzielen. Die <i>IGHV</i> -Subgruppengene können basierend auf ihrer Sequenzähnlichkeit weiter in <i>IGHV</i> -Gen-Clans (Clan I, II und III) kategorisiert werden. ¹⁵ Clan I umfasst die Subgruppengene <i>IGHV1</i> , <i>IGHV5</i> und <i>IGHV7</i> , Clan II umfasst die Subgruppengene <i>IGHV2</i> , <i>IGHV4</i> und <i>IGHV6</i> und Clan III umfasst das Subgruppengene <i>IGHV3</i> .
Klonal	<ul style="list-style-type: none"> Ein <i>Probenkennung</i>-Ergebnis (Gesamtwert), bei dem die Klonalität erkannt wird. Ein <i>Probenname</i>-Ergebnis (für einen MM), bei dem ein signifikanter Peak im gültigen Größenbereich erkannt wird.
Erkennung	Teil des Assays, bei dem Amplikons durch Kapillarelektrophorese getrennt und als Peaks detektiert werden.
<i>In-vitro</i>	Tritt außerhalb eines lebenden Organismus auf.
Unbestimmt	Ein Probenergebnis, bei dem alle 3 Mastermix-Ergebnisse (MM) unbestimmte Ergebnisse generierten, oder ein MM-Ergebnis, bei dem das Vorliegen oder Fehlen der Klonalität nicht bestimmt werden kann (d. h. mehrdeutiges Ergebnis)
Ungültig	Ein Probenergebnis, bei dem die 3 Mastermix-Ergebnisse ungültig sind, oder ein MM-Ergebnis, das die Gültigkeitskriterien nicht erfüllt (siehe Tabelle 8).
Lymphoproliferative Erkrankung	Eine Erkrankung, die durch die abnorme Proliferation von Lymphozyten gekennzeichnet ist.
Mastermix-Produkt	Bei der Amplifikation von 3 verschiedenen MM erzeugte Amplikons: <i>IGH</i> -Röhrchen A (FR1) MM, <i>IGH</i> -Röhrchen B (FR2) MM, <i>IGH</i> -Röhrchen C (FR3) MM.
Negativkontrolle	Eine Pufferlösung, die polyklonale DNA enthält; es wird erwartet, dass diese Kontrolle mit jedem Mastermix ein nicht-klonales Ergebnis erzeugt.
Nicht-klonal	Ein Probenergebnis, bei dem keine Klonalität nachgewiesen wird, oder ein MM-Ergebnis, bei dem kein signifikanter Peak innerhalb des gültigen Größenbereichs nachgewiesen wird.

Tabelle 1. Glossar der für den IdentiClone Dx *IGH* Assay spezifischen Begriffe

Begriff	Definition
Plattenbeschickung oder Plattenlayout	Visuelle Darstellung einer Detektionsplatte, die in den ABI Genanalysator importiert wurde. Diese Datei enthält eine Plattenbeschickung für eine 96-Well-Platte, das zugehörige Durchlaufinformationen enthält, einschließlich <i>Probenkennung</i> , <i>Probenname</i> , <i>Probentyp</i> und <i>Mastermix</i> für jede Wellposition.
Positivkontrolle	Eine Pufferlösung, die DNA enthält, die zur Beurteilung der Validität des Assays verwendet wird; es wird erwartet, dass diese Kontrolle mit jedem Mastermix ein klonales Ergebnis erzeugt.
Probenkennung	Eindeutige Identifizierung im Zusammenhang mit einer Patientenprobe. Jede <i>Probenkennung</i> muss mit jedem Mastermix (N = 3) getestet werden, der dem Assay beiliegt. Einzelne Mastermix- und laufspezifische Testergebnisse werden mit dem <i>Probennamen</i> identifiziert. Jeder Probenkennung sind mindestens 3 <i>Probenname</i> -Ergebnisse zugeordnet. Ein Beispiel ist in Abbildung 10 dargestellt.
Probenname	Eindeutige Identifizierung im Zusammenhang mit Mastermix und laufspezifischen Testergebnissen im Zusammenhang mit einer <i>Probenkennung</i> (Patientenprobe). Ein Beispiel ist in Abbildung 10 dargestellt.
Sättigung	Vorliegen eines Peaks mit übermäßig hoher RFU (≥ 30.000)
Größenqualitätsfehler (SQ)	Ein ABI 3500xL oder ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer hat einen Fehler festgestellt, bei dem die berechnete Ähnlichkeit zwischen dem Fragmentmuster des spezifischen Größenstandardfarbstoffs und der beobachteten Verteilung der Größenstandard-Peaks in einer Probe den vorgegebenen Schwellenwert nicht überschreitet.
Signifikanter Peak	Ein dominanter Peak innerhalb eines gültigen Größenbereichs.

3.2. Abkürzungen

Tabelle 2. Definitionen der Abkürzungen

Akronym	Definition
bp	Basispaar
CE	Kapillarelektrophorese; eine elektrokinetische Methode zur Größentrennung von Amplikons.
KI	Konfidenzintervall
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FNC	Dateinamenkonvention; ein Regelwerk zur Benennung von Dateien auf eine Art und Weise, die beschreibt, was sie enthalten und wie sie mit anderen Dateien in Verbindung stehen.
FSA	Vom Kapillarelektrophorese-Instrument erstellte Fragmentanalysedatendatei.
gDNA	Genomische DNA
IFU	Gebrauchsanweisung
<i>IGH</i>	Immunglobulin-Schwerketten-Gen
<i>IGHFR1/2/3</i>	Die konservierten Framework-Regionen 1, 2 und 3, wenn das <i>IGH</i> -Gen
IUO	Nur für Forschungszwecke
IVD	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
LL	Unterer Grenzwert
LoB	Leerwertgrenze
LoD	Nachweisgrenze
MM	Mastermix
k. A.	Nicht zutreffend
NTC	Nicht-Template-Kontrolle (Wasser); es wird erwartet, dass diese Kontrolle keine amplifizierten Peaks innerhalb des gültigen Größenbereichs erzeugt.
NPA	Negative prozentuale Übereinstimmung

Tabelle 2. Definitionen der Abkürzungen

Akronym	Definition
OPA	Gesamtübereinstimmung in Prozent
PB	Peripheres Blut
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPA	Positive prozentuale Übereinstimmung
PPB	Gepooltes peripheres Blut
RPR	Relatives Peak-Verhältnis, der Wert, der zur Bestimmung der Klonalität verwendet wird.
RUO	Nur für Forschungszwecke
SQ	Größenqualität; eine numerische Darstellung der Ähnlichkeit zwischen dem Fragmentmuster für den in der Größenstandarddefinition angegebenen Größenstandardfarbstoff und der tatsächlichen Verteilung der Größenstandard-Peaks in der Probe.
XLSX	Ein Dateiformat, das mit Office-2010-Versionen und höher kompatibel ist. Dieses Dateiformat kann verwendet werden, um den Plattendatensatz auf den ABI 3500xL Dx und ABI 3500xL Genetic Analyzers zu erstellen.
XML	Datei zum Speichern und Transportieren von Daten in Extensible Markup Language (Erweiterbare Markierungssprache). Dieses Dateiformat wird für die IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay-Instrumentenparameter, Ergebnisgruppe und Dateinamenkonvention für die ABI 3500xL Dx und ABI 3500xL Genetic Analyzers (im Lieferumfang von REF 91010111 enthalten) verwendet.

4. Zusammenfassung und Erläuterung des Assays

4.1. Hintergrund

Schätzungen zufolge werden jedes Jahr weltweit über 900.000 neue Fälle lymphoproliferativer B-Zell-Erkrankungen diagnostiziert, unter Berücksichtigung der Vielzahl von Krankheiten, die in diese Kategorie fallen.^{1,2,3} Lymphoproliferative B-Zell-Erkrankungen wie Lymphome und Leukämien entstehen häufig aufgrund einer Dysregulation der normalen Prozesse der B-Zell-Entwicklung, insbesondere bei Genumlagerungen der schweren Immunglobulinkette (*IGH*).

Während der Ontogenie von B-Lymphozyten wird das *IGH*-Gen einem Prozess namens V(D)J-Rekombination unterzogen, wobei die Variable (V_H), Diversität (D_H), und verbindende (J_H) Gensegmente nach dem Zufallsprinzip umgelagert werden.^{4,5} Diese umgelagerten Gensegmente erhöhen die genetische Vielfalt, indem sie ca. 10^{12} eindeutige DNA-Sequenzen generieren und es dem Immunsystem ermöglichen, eine Vielzahl von Antigenen zu erkennen.^{4,5,6} Bei lymphoproliferativen B-Zell-Erkrankungen breitet sich ein einzelner B-Zell-Klon jedoch mit einer bestimmten *IGH*-Reanordnung abnorm aus, was zu einer Population von B-Zellen mit identischen (oder klonalen) *IGH*-Genumlagerungen führt. Der Nachweis dieser klonalen Expansionen ist ein Kennzeichen von B-Zell-Malignitäten.^{4,5,6,7,8,9}

Wenn die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf diese Genumlagerungen angewendet wird, entstehen für jede Zelle Produkte, die in Länge und Sequenz einzigartig sind.^{6,7,8,9} Somit kann diese Methodik zur Identifizierung von Lymphozytenpopulationen angewendet werden, die aus einer einzigen Zelle stammen, indem die einzigartigen V-J-Genumlagerungen innerhalb des *IGH*-Lokus identifiziert werden.^{6,8,9,10} Das Vorhandensein klonaler *IGH*-Umlagerungen wird zur Bestätigung der Diagnose von B-Zell-Lymphoproliferativen Erkrankungen verwendet, um maligne von benignen lymphoiden Proliferationen zu unterscheiden.^{11,12,13,14}

4.2. Zusammenfassung

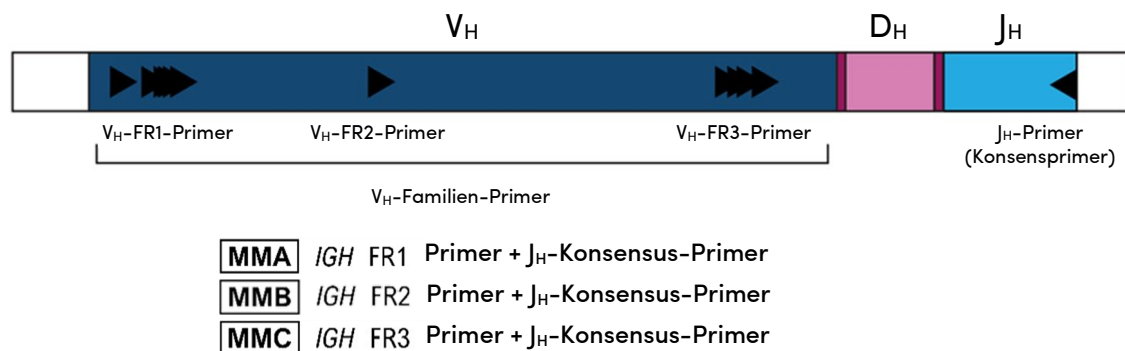
Der IdentiClone Dx *IGH* Assay umfasst drei PCR-Mastermixes (MMs), eine positive (*IGH* POS [+]) Kontrolle, eine negative (NEG [-]) Kontrolle, eine Nicht-Template-Kontrolle (NTC), Taq-DNA-Polymerase und das IdentiClone Dx *IGH* Softwarepaket. Assay-Mastermixe verwenden mehrere fluoreszierend markierte Konsensprimer, die auf die konservierten Framework-Regionen (FR1, 2 und 3) innerhalb der V_H - und J_H -Regionen des *IGH*-Lokus abzielen. Nach der Amplifikation werden die mit Fluorophor markierten Amplikons nach Größe fraktioniert, wodurch Amplikonprofile für jeden PCR-Mastermix erzeugt werden. Die resultierenden Daten werden dann zur Analyse in die IdentiClone Dx *IGH* Software hochgeladen, um die Gültigkeit und den Klonalitätsstatus zu bestimmen. Gültige Ergebnisse für jeden Mastermix werden zusammengestellt, um den Klonalitätsstatus für jede Probe zu ermitteln: Clonal (Klonal), Non-Clonal (Nicht-klonal), Invalid (Ungültig) oder Indeterminate (Unbestimmt).

5. Verfahrensgrundlagen

5.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Da die variable Region (V_H) somatischen Mutationen unterliegt, ist es schwierig, einen einzigen Satz PCR-Primer zu verwenden, um auf alle konservierten Regionen abzielen, die V_H - J_H -Reanordnungen flankieren. Aus diesem Grund verwendet der IdentiClone Dx *IGH* Assay mehrere Konsensus-PCR-Primer, die auf drei Framework-Regionen (FR1, FR2 und FR3) und die J_H -Region des *IGH*-Gens abzielen. Die Konsensusprimer sind mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert und in drei einzelnen Mastermixen enthalten: MMA, MMB und MMC. (Abbildung 1) Diese Mastermixe amplifizieren die drei Framework-Regionen (FR) und zwei komplementäritätsbestimmende Regionen (CDRs) aus genomischer DNA (gDNA), die aus peripheren Blutproben isoliert wurde.

Abbildung 1. Die Organisation eines umgelagerten Immunglobulin-Schwerkettengens auf Chromosom 14. Schwarze Pfeile zeigen die relativen Positionen der Primer, die die konservierte Framework-Region (FR1/2/3) und die downstream liegenden Consensus- J_H -Gensegmente. Die Amplikonprodukte, die aus jeder dieser Regionen erzeugt werden, können unter Verwendung von fluoreszierenden Primersets in Kapillarelektrophorese-Instrumenten mit differentieller Fluoreszenzdetektion voneinander unterschieden werden.



5.2. Fluoreszenzdetektion

Nach der Amplifikation wird jedes PCR-Produkt auf einem ABI 3500xL Dx oder ABI 3500xL Genetic Analyzer verarbeitet, in denen Fluorophor-markierte Amplikons nach Größe fraktioniert werden. Assayspezifische Durchlaufparameter wie Instrumenteneinstellungen, Ergebnisgruppe und Dateinamenkonventionen sind als XML-Dateien im IdentiClone Dx *IGH* Softwarepaket enthalten und müssen vor der ersten Durchführung des Assays konfiguriert werden. Nach der Konfiguration werden die Amplikonprofile jedes PCR-Mastermixes im FSA-Dateiformat erfasst und zur Interpretation in die IdentiClone Dx *IGH* Software hochgeladen.

5.3. Softwareanalyse

Die IdentiClone Dx *IGH* Software wurde entwickelt, um den IdentiClone Dx *IGH* Assay zu ergänzen und die Subjektivität der Elektropherogramminterpretation zu eliminieren. Die von den Assay-Amplikons mit Fluoreszenzdetektion generierten Rohdatendateien werden auf Gültigkeit und Klonalitätsstatus analysiert, während auf eine konfigurierte Plattenbeschickung zur Rückverfolgbarkeit der Probe verwiesen wird.

Da für diesen Assay drei Mastermixe erforderlich sind, um den Klonalitätsstatus zu bestimmen, wird eine Benennungshierarchie verwendet, um die Mastermix-Ergebnisse, die durch einen *Probenamen* identifiziert werden, mit der Patientenprobe zu korrelieren, die durch eine *Probenkennung* identifiziert wird (siehe Abbildung 9). Jeder Mastermix-Testsatz, einschließlich Proben, einer Positivkontrolle, einer Negativkontrolle und einer Nicht-Template-Kontrolle, gilt als „Durchlauf“ und kann mit der Funktion Software Plate Setup (Software Platteneinrichtung) einzeln konfiguriert und auf dieselbe Platte geladen werden, die zusätzliche Durchläufe enthält. Nach Abschluss der Detektion werden die Datendateien in die Software hochgeladen, die mit der Analyse fortfährt und sich auf die Plattenbeschickung bezieht, um die Zwischenanalyse für diesen Mastermix abzuschließen. Wenn Läufe für alle drei Mastermixe als gültig eingestuft werden, werden die Daten verarbeitet, um Zwischenergebnisse zu generieren, die nach *Probenamen* dargestellt werden und die dem Benutzer angezeigt werden, um den Klonalitätsstatus für jede *Probenkennung* auszuwählen und zu generieren. Für weitere Einzelheiten siehe die Gebrauchsanweisung der entsprechenden IdentiClone Dx *IGH* Software.

5.4. Endnutzer und vorgesehenes Verwendungsumfeld

- 5.4.1. Das Produkt ist nur für die professionelle Verwendung in einem klinischen Labor vorgesehen.
 5.4.2. Das Produkt ist nicht für patientennahe Tests oder Selbsttests bestimmt.
 5.4.3. Das Gerät ist kein Begleitdiagnostik-Assay.

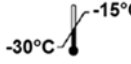

6. Reagenzien

6.1. Reagenzienbestandteile

Tabelle 3. Verfügbare Kits

Katalognummer	Beschreibung	Menge
REF 91010101	IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay	33 Reaktionen

Tabelle 4. Reagenzienkomponenten (Komponenten im Kit)

Reagenz	Artikelnummer	Reagenzienbestandteile (Wirkstoffe)	Verpackungseinheit	Anzahl der Einheiten	Lagertemperatur
Mastermixe	REF 21010191	MMA <i>IGH</i> FR1 Mehrere Oligonukleotide, die auf die FR-Region 1 des Immunglobulin-Schwerketten-Gens abzielen, in gepufferter Salzlösung.	1500 µl	1	 -30°C -15°C
	REF 21010201	MMB <i>IGH</i> FR2 Mehrere Oligonukleotide, die auf die FR-Region 2 des Immunglobulin-Schwerketten-Gens abzielen, in gepufferter Salzlösung.	1500 µl	1	
	REF 21010211	MMC <i>IGH</i> FR3 Mehrere Oligonukleotide, die auf die FR-Region 3 des Immunglobulin-Schwerketten-Gens abzielen, in gepufferter Salzlösung.	1500 µl	1	
DNA der <i>IGH</i> -Positivkontrolle	REF 40883460	CONTROL + <i>IGH</i> gDNA aus kultivierten Zellen in gepufferter Salzlösung	100 µl	1	
DNA für die Negativkontrolle	REF 40920070	CONTROL - gDNA aus kultivierten Zellen in gepufferter Salzlösung	100 µl	1	
Nicht-Template-Kontrolle (NTC)	REF 40930010	CONTROL NTC Wasser	100 µl	1	
FalconTaq® DNA-Polymerase	REF 60970150	TAQ FalconTaq DNA-Polymeraseenzym	50 µl	1	
IdentiClone Dx <i>IGH</i> Softwarepaket	REF 91010111	IdentiClone Dx <i>IGH</i> Software <ul style="list-style-type: none"> IdentiClone-Dx-<i>IGH</i>-Software-1.2.x.IVD.msi Parameter des IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay <ul style="list-style-type: none"> IGH_IP.xml IGH_FNC.xml IGH_RG.xml 	1 Softwarepaket	1	 15°C 30°C

6.2. Lagerung und Handhabung von Reagenzien

- 6.2.1. Sofern das Assay-Kit nicht sofort verwendet wird, ist es **bei -30 °C bis -15 °C zu lagern**.
- 6.2.1.1. PCR-Mastermixe im Dunkeln lagern, um mit Fluorophor markierte Primer zu schützen.
- 6.2.2. Nach dem Öffnen des Assay-Kits jedes Reagenz visuell auf Schäden und/oder Undichtigkeiten untersuchen.
- 6.2.3. Alle Reagenzien und Kontrollen vor Gebrauch auftauen und gründlich vortexen, um sicherzustellen, dass sie vollständig resuspendiert und homogen sind.

ACHTUNG! **Übermäßiges Mischen auf dem Vortex kann die DNA scheren und dazu führen, dass markierte Primer ihre Fluorophore verlieren. Das Röhrchen mit der Taq DNA-Polymerase NICHT vortexen.**

- 6.2.3.1. Das Volumen 5 bis 15 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit vortexen.
- 6.2.3.2. 2 bis 5 Sekunden zentrifugieren.
- 6.2.3.3. Bei weisungsgemäßer Lagerung und Handhabung sind geöffnete Materialien 6 Monate, 5 Einfrier-Auftau-Zyklen oder bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Kits nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.

6.3. Warn- und Vorsichtshinweise

IVD Dieses Produkt ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt.

- 6.3.1. Dieses Assay-Kit als System verwenden. Keine Reagenzien anderer Hersteller verwenden. 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.
- 6.3.2. Optimale Leistung und Reproduzierbarkeit können nur bei Einhaltung des Protokolls gewährleistet werden. Sicherstellen, dass das korrekte Thermocycler-Programm verwendet wird, da andere Programme zu inkorrekten/fehlerhaften Daten, wie zum Beispiel zu falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen, führen können.
- 6.3.3. Nicht verwendete Reagenzien gemäß lokal, regional oder national gültigen Bestimmungen entsorgen.
- 6.3.4. Reagenzien aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern nicht kombinieren.
- 6.3.5. Laborpersonal muss bei der Arbeit mit Proben persönliche Schutzausrüstung tragen, sich an die Richtlinien der guten Laborpraxis halten und die allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen anwenden. Proben müssen stets in zugelassenen biologischen Sicherheitsbereichen gehandhabt und dürfen nur in zugelassenen Sicherheitswerkbänken geöffnet werden.
- 6.3.6. Aufgrund der analytischen Empfindlichkeit dieses Tests ist die Kontamination der Reagenzien oder Amplifikationsmische durch Proben, Kontrollen und/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.
- 6.3.7. Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos Handschuhe tragen, wenn Proben und Reagenzien verarbeitet werden, und Arbeitsbereiche und Pipetten vor der PCR regelmäßig reinigen.
- 6.3.8. Autoklavieren beseitigt keine DNA-Kontamination.
- 6.3.9. Der Arbeitsablauf im PCR-Labor sollte unidirektional zwischen verschiedenen Arbeitsbereichen ablaufen: zunächst Vorbereitung des Mastermix, anschließend Probenaufbereitung, dann Amplifikation und abschließend Nachweis. Keine Amplikons (d. h. PCR-Platte nach der Amplifikation) in die für den Mastermix oder die Probenvorbereitung vorgesehenen Bereiche bringen.
- 6.3.10. Alle in einem bestimmten Laborbereich verwendeten Pipetten, Pipettenspitzen und anderen Ausstattungen müssen in diesem Laborbereich verbleiben.
- 6.3.11. Wann immer möglich, ist zur Vermeidung einer Kontamination mit RNase oder DNase oder einer Kreuzkontamination steriles Einweg-Plastik zu verwenden.
- 6.3.12. Sobald ein POP-7-Polymerbeutel Raumtemperatur erreicht hat, das Innere des Halses am Installationsort untersuchen. Sicherstellen, dass der Beutel frei von getrocknetem oder kristallisiertem Polymer ist. Den Beutel nicht auf dem ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer installieren, wenn Kristallisation beobachtet wird, da Kristallisation die Leistung des Assays und/oder Instruments beeinträchtigen kann. Den Kundendienst von Thermo Fisher Scientific hinzuziehen.
- 6.3.13. Jeder schwerwiegende Vorfall in Bezug auf das Produkt muss dem Hersteller und der zuständigen Behörde im Mitgliedstaat des Nutzers und/oder Patienten gemeldet werden.

6.4. Reagenzien, Materialien und Ausrüstung

Alle Ausrüstungsgegenstände gemäß den Anweisungen des Herstellers warten. Tabelle 5 sind die erforderlichen Reagenzien, Materialien und Ausrüstung aufgeführt, die nicht im Kit enthalten sind.

Tabelle 5. Zusätzliche Reagenzien, Materialien und erforderliche Ausrüstung (nicht im Lieferumfang enthalten)

Reagenz/Material/Ausrüstung	Empfohlene Lieferanten und Reagenzien/Materialien/Ausrüstung	Anmerkungen
8-Deckelstreifen	k. A.	Ohne RNase, DNase, DNA, PCR-Hemmer
Septa mit 96 Wells	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Septa für 3500xL Dx Genetic Analyzers, 96 Wells Septa für 96-Well-Platten, für 3500/SeqStudio™ Flex 	k. A.
Klebefolie zum Versiegeln der Platte	k. A.	Ohne RNase/DNase
Behälter für Anodenpuffer	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Anodenpufferbehälter für 3500 Dx/3500xL Genetic Analyzers Anodenpufferbehälter (ABC), für 3500/SeqStudio Flex 	Ohne RNase/DNase
Kalibrierte Pipetten	k. A.	Müssen für die genaue Messung von Volumina zwischen 1 µl und 1000 µl geeignet sein.
Kapillar-Array	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> 3500xL Dx Genetic Analyzer 24-Kapillar-Array, 50 cm 3500xL Genetic Analyzer 24-Kapillar-Array, 50 cm 	k. A.
Kapillarelektrophorese-Instrument	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> (EU) 3500xL Dx Genetic Analyzer mit 3500 Dx Series Data Collection Software 3 IVD v3.0 (USA) 3500xL Dx Genetic Analyzer mit 3500 Dx Series Data Collection Software 3 IVD v3.2 3500xL Genetic Analyzer mit 3500 Series Data Collection Software v1.0 	Sicherstellen, dass das Instrument mit dem DS-33 Matrix Standard Kit (Farbstoffset G5) mit GeneScan 600 LIZ Size Standard v2.0 kalibriert ist.
Kathodenpufferbehälter	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Kathodenpufferbehälter für 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzers Kathodenpufferbehälter (CBC), für 3500/SeqStudio Flex 	k. A.
Kathodenpuffer Septa	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Septa-Kathodenpufferbehälter für 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzers Septa-Kathodenpufferbehälter, für 3500 und SeqStudio Flex 	k. A.
Konditionierungsreagenz	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Konditionierungsreagenz für 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzers Konditionierungsreagenz, für 3500/SeqStudio Flex 	k. A.
Pipettenspitzen mit Filter	k. A.	Steril, ohne RNase/DNase/Pyrogene
Hi-Di Formamide	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Hi-Di™ Formamide, Serie 3500 Dx Hi-Di Formamide 	k. A.

Tabelle 5. Zusätzliche Reagenzien, Materialien und erforderliche Ausrüstung (nicht im Lieferumfang enthalten)

Reagenz/Material/ Ausrüstung	Empfohlene Lieferanten und Reagenzien/Materialien/Ausrüstung	Anmerkungen
Röhrchen mit geringer Bindung	k. A.	Zur Aufbewahrung von gDNA; RNase, DNase, DNA, PCR-Inhibitorfrei
LIZ Size Standards	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> GeneScan™ 600 LIZ® Größe Standard v2.0 – Dx GeneScan 600 LIZ™ Dye Size Standard v2.0 	k. A.
Mikrozentrifuge	k. A.	Steril
Mikrovolumen-UV-Vis- Spektralphotometer	k. A.	Kann Absorption bei 260 nm zur Berechnung der Nukleinsäure-konzentration messen
PCR-Platten oder - Röhrchen	k. A.	Ohne RNase, DNase, DNA, PCR-Hemmer
Plattenzentrifuge	k. A.	Zentrifuge für 1000 RCF
POP-7 Polymer	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> POP-7™ (384) Performance Optimized Polymer 3500 Dx Series POP-7 Polymer, für 3500/SeqStudio™ Flex 	k. A.
Halter und Basisset	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Retainer & Base Set (Standard) für 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzers, 96-Well Retainer & Base Set (Standard) für 3500/3500xL Genetic Analyzers, 96-Well 	k. A.
Steriles Wasser	k. A.	Steril, DNase-/RNase-frei
Thermocycler	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> Veriti™ Dx 	k. A.
Tris-EDTA (TE) Puffer	k. A.	Lösung aus 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 1 mM EDTA Hinweis: 1:10 mit Wasser verdünnen
Vortexmischer	k. A.	k. A.

Artikelnummern in Ihrer Region beim Hersteller erfragen.

7. Probenentnahme und -vorbereitung

7.1. 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.

7.2. Störsubstanzen

Es ist bekannt, dass die folgenden Substanzen die PCR-Amplifikation stören. Nach Möglichkeit vermeiden:

- 7.2.1. Divalente Kationen (Chelatbildner)
- 7.2.2. Low-Retention-Pipettenspitzen
- 7.2.3. EDTA (in geringen Konzentrationen zu vernachlässigen)
- 7.2.4. Heparin

7.3. Anforderungen und Stabilität von Proben

Für diesen Assay sind mindestens 0,5 ml mit EDTA antikoaguliertes peripheres Blut erforderlich.

- 7.3.1. Die Probe kann vor dem Test bis zu 7 Tage bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt werden.
- 7.3.2. Die Probe kann mit einer Kühlpackung geliefert werden; sie darf niemals eingefroren werden.

7.4. Probenvorbereitung

- 7.4.1. Die gDNA aus Proben < 7 Tage nach der Entnahme extrahieren.
- 7.4.2. Die extrahierte gDNA mit einem Mikrovolumen-UV-Vis-Spektralphotometer quantifizieren.
- 7.4.3. Eine Verdünnung von gDNA in 50 ng/µl mit 1/10 TE ansetzen.
 - 7.4.3.1. Für die Amplifikation mit jedem Mastermix sind 5 µl gDNA in einer Konzentration von 50 ng/µl erforderlich.
 - Mindestens 15 µl bis 20 µl verdünnte gDNA vorbereiten.
 - 7.4.3.2. Wenn die verfügbare gDNA-Konzentration < 50 ng/µl beträgt, die Patientenproben erneut extrahieren.

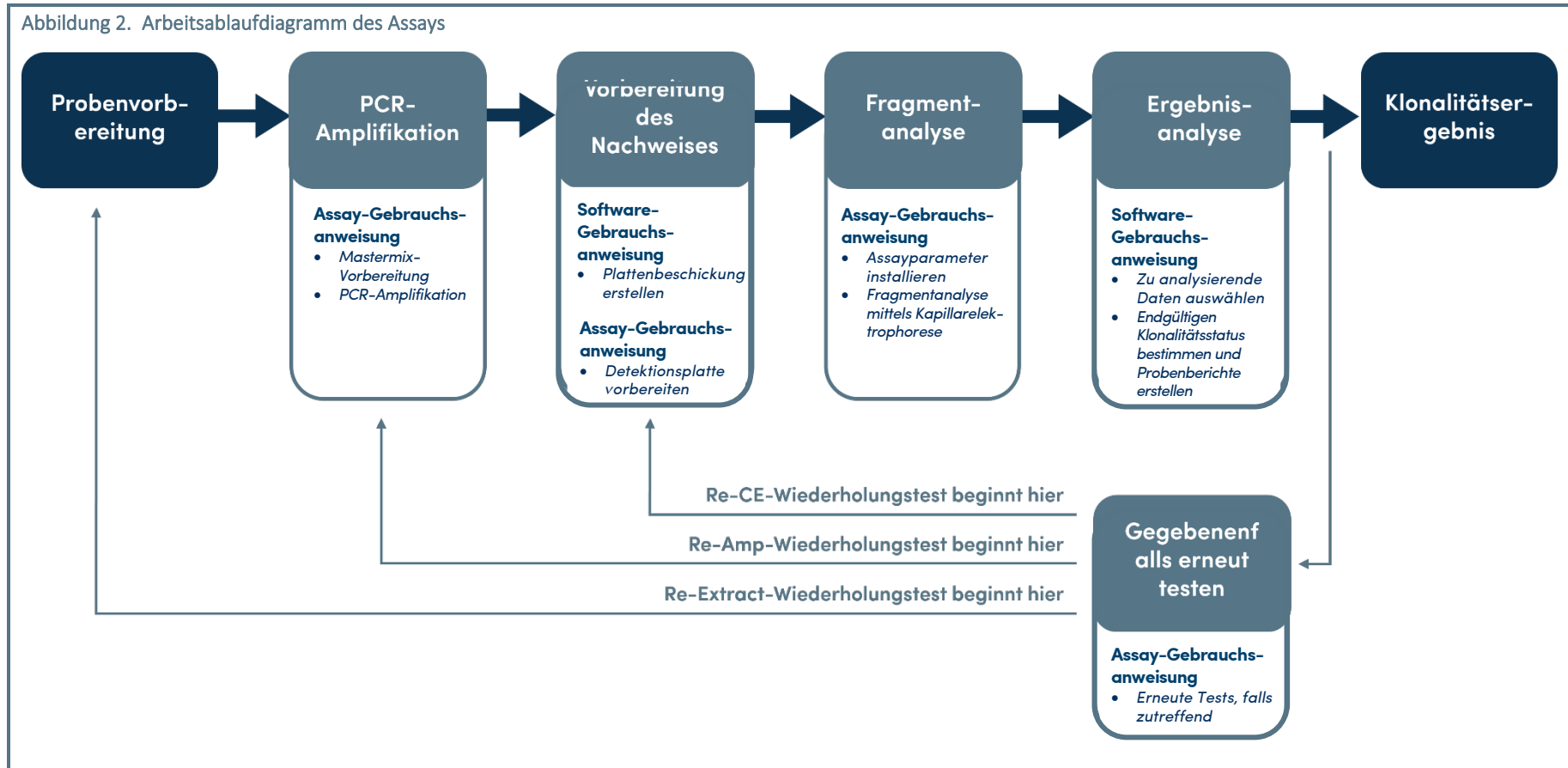
7.5. Probenlagerung

- 7.5.1. gDNA bis zu 7 Tage vor Gebrauch bei 2 °C bis 8 °C oder bis zu 3 Jahre vor Gebrauch bei -30 °C bis -15 °C aufbewahren.
- 7.5.2. Verdünnte gDNA-Proben in Röhrchen mit geringer Bindung aufbewahren.

8. Assay-Verfahren

Anmerkung: Dieser Assay erfordert die Verwendung dieses Dokuments in Verbindung mit der Gebrauchsanweisung der IdentiClone Dx *IGH* Software.

Abbildung 2. Arbeitsablaufdiagramm des Assays



8.1. Mastermix-Vorbereitung

- Bei jedem Durchlauf Durchlaufkontrollen (Positiv-, Negativ- und Nicht-Template-Kontrolle) mit einbeziehen.
 - Für den Test mit jedem Mastermix ist ein Probenreplikat erforderlich.
- 8.1.1. Mastermix(e), Positivkontrolle, Negativkontrolle, NTC und verdünnte gDNA-Probe (50 ng/μl) aus der Lagerung nehmen und das/die Röhrchen bei Raumtemperatur vollständig auftauen lassen. Anschließend ca. 15 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit vortexen.
- 8.1.2. Die Taq DNA Polymerase aus der Lagerung nehmen und kalt halten (d. h. auf Eis oder auf einem Kühlblock).

ACHTUNG! Das Taq-DNA-Polymerase-Enzymröhrchen NICHT vortexen.

- 8.1.2.1. Mithilfe einer Mikrozentrifuge die Röhrchen 2 bis 5 Sekunden zentrifugieren.

Anmerkung: Die Zentrifugierschritte sind erforderlich, um die gesamte Flüssigkeit am Boden eines Röhrchens oder eines Plattenwells aufzufangen. Ungefähre Geschwindigkeiten und Zeiten können verwendet werden, wenn der Benutzer die erfolgreiche Erfassung visuell bestätigt. Die aufgeführten Geschwindigkeiten und Dauern sind als Empfehlung aufgeführt.

- 8.1.3. Anhand der nachstehenden Richtlinien die Gesamtzahl der Reaktionen (N) für jeden Mastermix berechnen.
- Mindestens ein zusätzliches Reaktionsvolumen mit einschließen, um den Pipettierfehler zu berücksichtigen.

n	Anzahl der Proben
+ 1	Positivkontroll-DNA (<i>IGH</i> POS (+))
+ 1	Negativkontroll-DNA (NEG (-))
+ 1	Nicht-Template-Kontrolle (NTC)
+ 1	zusätzliches Reaktionsvolumen
N = (n + 4)	Anz. Proben + 3 Kontrollen + 1 zusätzliches Reaktionsvolumen

- 8.1.3.1. Das berechnete Volumen für jeden Mastermix in separate, beschriftete Röhrchen mit **N × 45 μl** geben.
- 8.1.3.2. Das berechnete Volumen der Taq DNA Polymerase mit **N × 0,25 μl** zu jedem Mastermix hinzufügen.
- 8.1.3.3. Mastermix + Taq DNA-Polymeraselösung(en) 5 bis 15 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit vortexen.
- Die Taq DNA-Polymerase NICHT vor der Zugabe zu jedem Mastermix vortexen. Erst nach der Formulierung mit dem Mastermix vortexen.
- 8.1.3.4. Die Röhrchen in einer Mikrozentrifuge zwischen 2 und 5 Sekunden zentrifugieren.
- 8.1.4. Für jede Reaktion 45 μl des MM und der Taq-DNA-Polymerase-Lösung(en) mit 5 μl der Vorlage (verdünnte gDNA-Probe in 50 ng/μl, Positivkontrolle, Negativkontrolle oder NTC) in die entsprechenden einzelnen Wells in einer PCR-Platte oder Röhrchen geben.
- 8.1.4.1. Mehrmals pipettieren und anschließend das Röhrchen verschließen oder die Platte mit Deckelstreifen oder Versiegelungsfolie versiegeln; ODER
- 8.1.4.2. Das Röhrchen verschließen oder die Platte mit Deckelstreifen oder Versiegelungsfolie versiegeln. Anschließend ca. 15 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit vortexen.
- 8.1.4.3. Bei Verwendung eines PCR-Röhrchens mit einer Mikrozentrifuge 2 bis 5 Sekunden lang zentrifugieren. Bei Verwendung einer PCR-Platte die Platte ca. 30 Sekunden lang bei 1000 RCF zentrifugieren.

8.2. PCR-Amplifikation

- 8.2.1. Das/Die Röhrchen bzw. die Platte gemäß den PCR-Parametern in Tabelle 6 amplifizieren.
- 8.2.1.1. Sicherstellen, dass *Reaction Volume (Reaktionsvolumen)* auf **50 µl** und *Cover Temperature (Deckeltemperatur)* auf **105 °C** eingestellt sind.
- 8.2.1.2. Sicherstellen, dass *Reaction Volume (Reaktionsvolumen)* auf **50 µl** und *Cover Temperature (Deckeltemperatur)* auf **105 °C** eingestellt sind.
- 8.2.2. Nachdem das PCR-Programm abgeschlossen ist, die Amplifikationsplatte aus dem Thermocycler nehmen.
- 8.2.2.1. PCR-Produkte können vor dem Nachweis bei 2 °C bis 8 °C bis zu 7 Tage oder bei -30 °C bis -15 °C bis zu 3 Monate gelagert werden.
- 8.2.2.2. Vor dem Fortfahren mit Abschnitt 8.3 den Abschnitt *Create Platemap (Plattenbeschickung erstellen)* in der Software-Gebrauchsanweisung befolgen, um eine Plattenbeschickung zu erstellen.

Tabelle 6. PCR-Parameter

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen	Rampenrate
1	95 °C	7 Minuten	1	75 %
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	∞	Hold (Halten)	

8.3. Detektionsplatte vorbereiten

Anmerkung: Sicherstellen, dass die Plattenbeschickung gemäß dem Abschnitt *Plattenbeschickung erstellen* in der Software-Gebrauchsanweisung erstellt wurde.

- 8.3.1. Eine geeignete Anzahl Hi-Di-Formamide-Röhrchen bei Raumtemperatur auftauen lassen.
- Hi-Di Formamide, die Einheitsgröße der 3500 Dx Series beträgt 5 ml.

Anmerkung: Um Einfrier-Auftau-Zyklen zu vermeiden, kann Hi-Di Formamide aufgetaut, gemischt und in 2-ml-Röhrchen mit einem Volumen von 1 ml aliquotiert und gemäß den Anweisungen des Herstellers gelagert werden.

- 8.3.2. Ein Röhrchen LIZ Size Standard v2.0 Dx aus dem Lager nehmen.
- 8.3.3. Sowohl Hi-Di Formamide als auch LIZ Size Standard 5 bis 15 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit vortexen.
- 8.3.4. Die Röhrchen etwa 2 bis 5 Sekunden zentrifugieren.
- 8.3.5. In einem neuen volumengerechten Röhrchen die erforderliche Menge Hi-Di Formamide mit den LIZ Size Standards kombinieren.
- 8.3.5.1. Das endgültige Verhältnis muss **0,056** betragen (56 µl LIZ Size Standard + 1000 µl Hi-Di Formamide).
- Sicherstellen, dass das Volumen der LIZ:Hi-Di-Lösung ausreicht, um 19 µl pro Reaktion zu aliquotieren.
- 8.3.5.2. Die Lösung 5 bis 15 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit vortexen und anschließend 2 bis 5 Sekunden zentrifugieren.
- 8.3.6. Die Amplifikationsplatte bzw. die Röhrchen aus Abschnitt 8.2.2 30 Sekunden lang bei 1000 RCF zentrifugieren.
- 8.3.7. In einer neuen PCR-Platte mit 96 Wells 19 µl LIZ:Hi-Di-Lösung mit 1 µl PCR-Produkt pro Well kombinieren.
- Sicherstellen, dass nur eine Reaktionsvorlage (*d. h.* Probe, Positivkontrolle, Negativkontrolle, Nicht-Template-Kontrolle) pro Well vorhanden ist.
- 8.3.8. 20 µl Hi-Di Formamide in alle leeren Wells innerhalb der 24-Well-Injektion geben.
- Jede Injektion auf dem ABI 3500xL Dx oder ABI 3500xL Genetic Analyzer beurteilt jeweils 24 Wells.

- 8.3.9. Die Detektionsplatte mithilfe einer der beiden folgenden Methoden mischen:
- 8.3.9.1. Mehrmals auf und ab pipettieren und anschließend die Platte mit Deckelstreifen oder Versiegelungsfolie versiegeln; **ODER**
 - 8.3.9.2. Die Platte mit Deckelstreifen oder Versiegelungsfolie versiegeln und anschließend 15 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit vortexen.
 - 8.3.9.3. Die Platte 30 Sekunden lang bei 1000 RCF zentrifugieren.
 - 8.3.9.4. Die Detektionsplatte gemäß den Parametern in Tabelle 7 auf dem Thermocycler denaturieren.

Anmerkung: Siehe Abschnitt 8.3.1, um zu bestätigen, dass die ABI-Reagenzvolumina für den Durchlauf ausreichend sind.

Tabelle 7. Denaturierungsparameter

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen	Rampenrate
1	95 °C	3 Minuten	1	75 %
2	4 °C	5 Minuten	1	

- 8.3.9.5. Sicherstellen, dass *Reaction Volume (Reaktionsvolumen)* auf **20 µl** und *Cover Temperature (Deckeltemperatur)* auf **105 °C** eingestellt sind.
- 8.3.10. Den Durchlauf starten.
 - 8.3.10.1. Nach Abschluss des Denaturierungsprogramms die Detektionsplatte aus dem Thermocycler nehmen und 30 Sekunden lang bei 1000 RCF zentrifugieren.








8.4. Assayparameter installieren

Die Assayparameter können aus der mitgelieferten *IGH IP.xml*-Datei importiert werden, die im Paket der IdentiClone Dx IGH Software (REF 91010111) enthalten ist und die *ABI 3500 Dx Series Data Collection Software 3 IVD Library* erfordert.

Anmerkung: Abschnitt 8.4 ist für die erste Verwendung dieses Assays mit einem ABI-Instrument erforderlich.

Anmerkung: Vor dem Fortfahren mit Abschnitt 8.5 bestätigen, dass die Assayparameter korrekt eingestellt sind.

ACHTUNG! Die Parameter des Instrumenten- und Größenbestimmungsprotokolls bestimmen, wie die Proben verarbeitet werden (d. h. Fragmentanalyse). Die Sicherstellung, dass die richtigen Parameter mit dem richtigen Assaynamen (*IGH Instrument Parameters (IGH-Instrumentenparameter)*) gespeichert werden, ist für die korrekte Assayausführung unerlässlich.

- 8.4.1. Die Instrumentenparameter des IdentiClone Dx IGH Assay in das ABI-Instrument importieren.
 - 8.4.1.1. Auf das Symbol **ABI 3500 Dx** doppelklicken, um die Data Collection Software 3 IVD der 3500 Dx Serie zu öffnen.
 - 8.4.1.1.1. Im Dashboard-Menü auf **Library (Bibliothek)** () klicken.
 - 8.4.1.1.2. Auf **Manage (Verwalten)** () klicken und dann **Assays (Assays)** aus dem Dropdown-Menü auswählen.
 - 8.4.1.1.2.1. Das Symbol **Import (Importieren)** () wählen, dann zum Dateipfad für das Softwarepaket navigieren und *IGH-IP.xml* wählen.
- 8.4.2. Die Konvention für den Dateinamen des IdentiClone Dx IGH Assay in das ABI-Instrument importieren.
 - 8.4.2.1.1. Auf **Manage (Verwalten)** () klicken und dann **File Name Convention (Dateinamenkonvention)** aus dem Dropdown-Menü auswählen.
 - 8.4.2.1.1.1. Das Symbol **Import (Importieren)** () wählen, dann zum Dateipfad für das Softwarepaket navigieren und *IGH-FNC.xml* wählen.
- 8.4.3. Die Ergebnisgruppe des IdentiClone Dx IGH Assay in das ABI-Instrument importieren.
 - 8.4.3.1.1. Auf **Manage (Verwalten)** () klicken und im Dropdown-Menü die Option **Results Group (Ergebnisgruppe)** auswählen.
 - 8.4.3.1.1.1. Das Symbol **Import (Importieren)** () auswählen, dann zum Dateipfad für das Softwarepaket navigieren und *IGH-RG.xml* wählen.

- 8.4.4. Sicherstellen, dass die richtigen Parameter für das *Instrument Protocol (Instrumentenprotokoll)* (Abbildung 3) und das *Sizecalling Protocol (Größenbestimmungsprotokoll)* (Abbildung 4) korrekt konfiguriert und in der Assay-Bibliothek der ABI 3500 Data Collection Software gespeichert wurden.

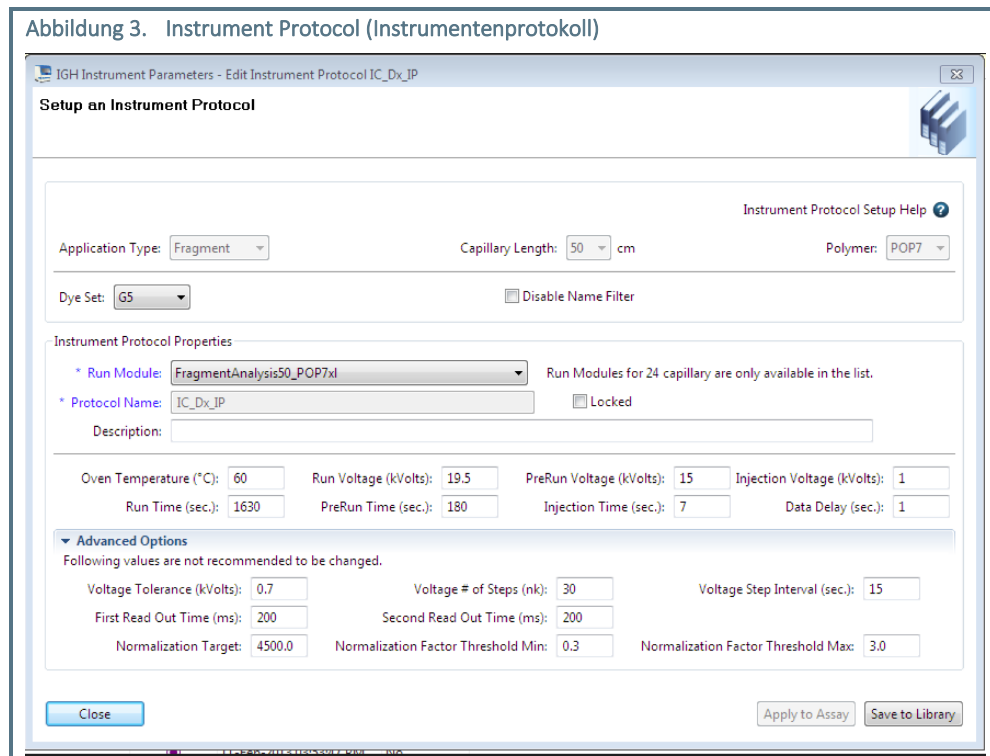
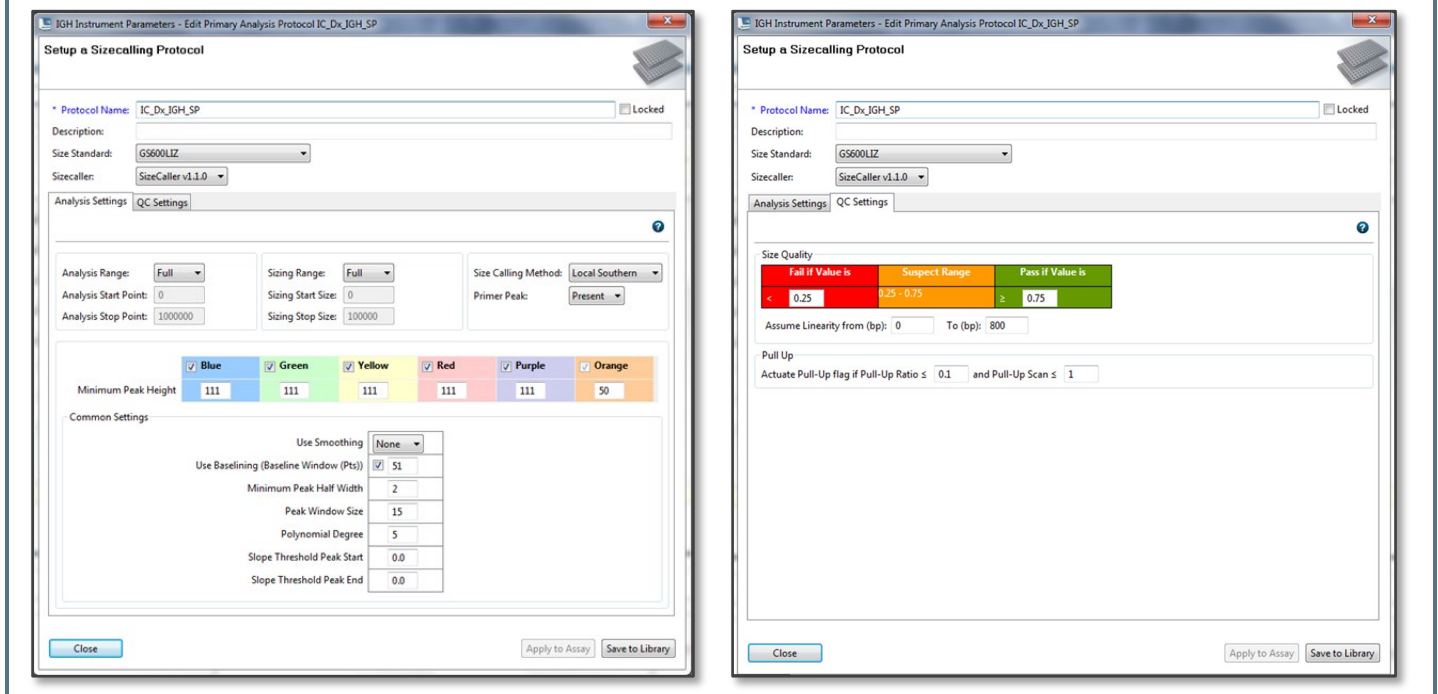
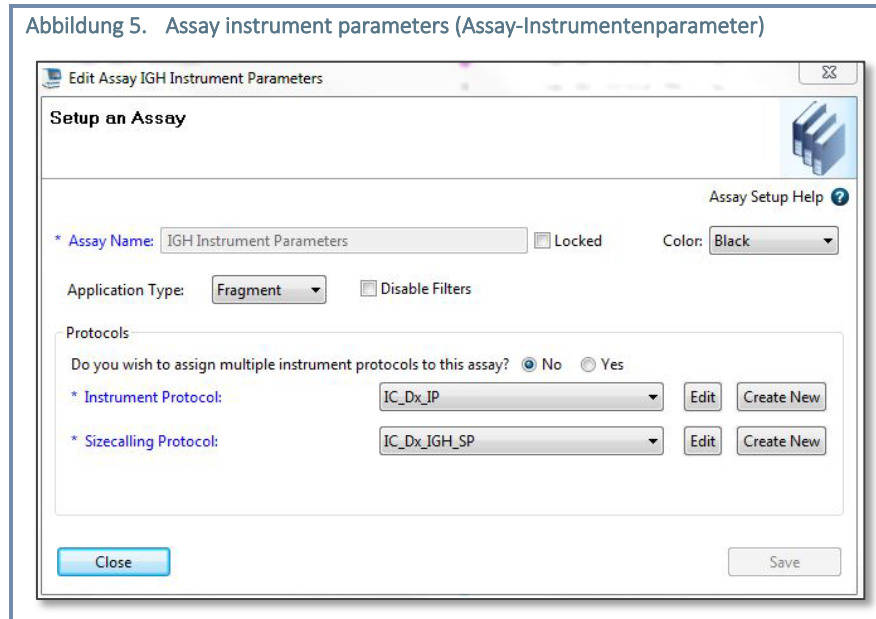



Abbildung 4. Registerkarten für das Größenskalierungsprotokoll

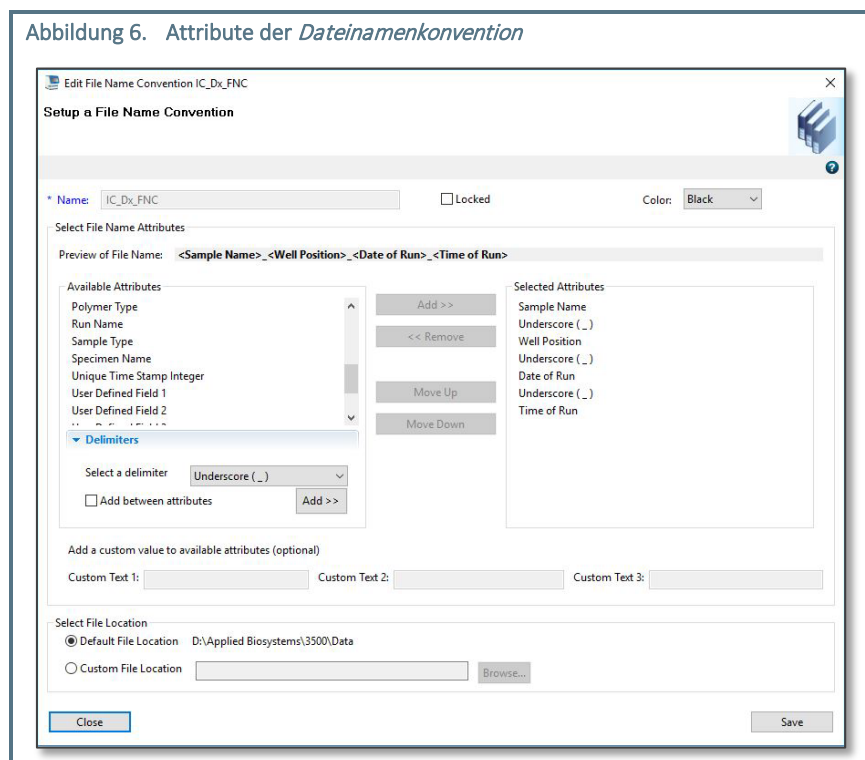



- 8.4.4.1. Die Assayparameter in der Bibliothek des ABI 3500 Dx Assay unter dem Namen *IC_Dx_IP* für das Instrumentenprotokoll und *IC_Dx_IGH_SP* für das Größenbestimmungsprotokoll speichern, **genau** wie in Abbildung 5 dargestellt.



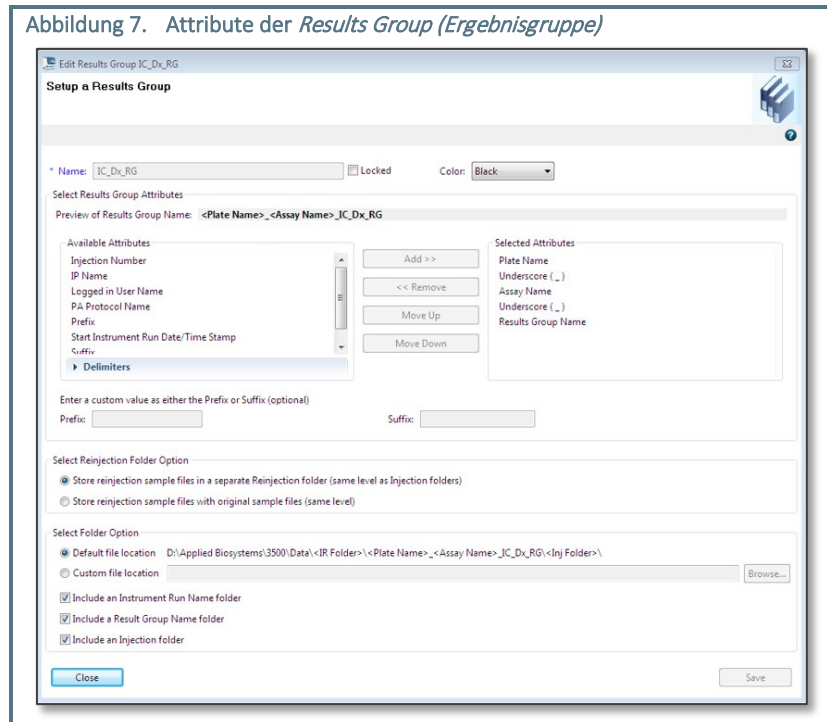
- 8.4.4.2. Im Abschnitt *File Name Conventions (Konventionen für Dateinamen)* auf das Stiftsymbol  klicken, um sicherzustellen, dass die Einstellungen für Dateinamenkonvention (FNC) mit denen in Abbildung 6 übereinstimmen und als *IC_Dx_FNC* gespeichert werden (genau wie dargestellt).
- 8.4.4.2.1. Die FNC legt fest, welche Datenfelder und in welcher Reihenfolge die resultierenden Datendateien (FSA-Dateien) enthalten werden.
- 8.4.4.2.2. Überprüfen, ob die ausgewählten Attribute mit der in Abbildung 6 dargestellten Reihenfolge übereinstimmen.

ACHTUNG: Bestätigen, dass das Feld *Sample Name (Probenname)* in der Liste *Selected Attributes (Ausgewählte Attribute)* an erster Stelle steht.



- 8.4.5. Im Abschnitt *Results Group (Ergebnisgruppe)* auf das **Stiftsymbol**  klicken, um sicherzustellen, dass die Einstellungen der *Results Group (Ergebnisgruppe)* (RG) mit denen in Abbildung 7 übereinstimmen und als **IC_Dx_RG** gespeichert werden (**genau** wie dargestellt).
- 8.4.5.1. Die Ergebnisgruppe wird verwendet, um die Ordner, in denen Probandendateien gespeichert sind, zu benennen, zu sortieren und anzupassen.
- 8.4.5.2. Überprüfen, ob die ausgewählten Attribute mit der in Abbildung 7 dargestellten Reihenfolge übereinstimmen.

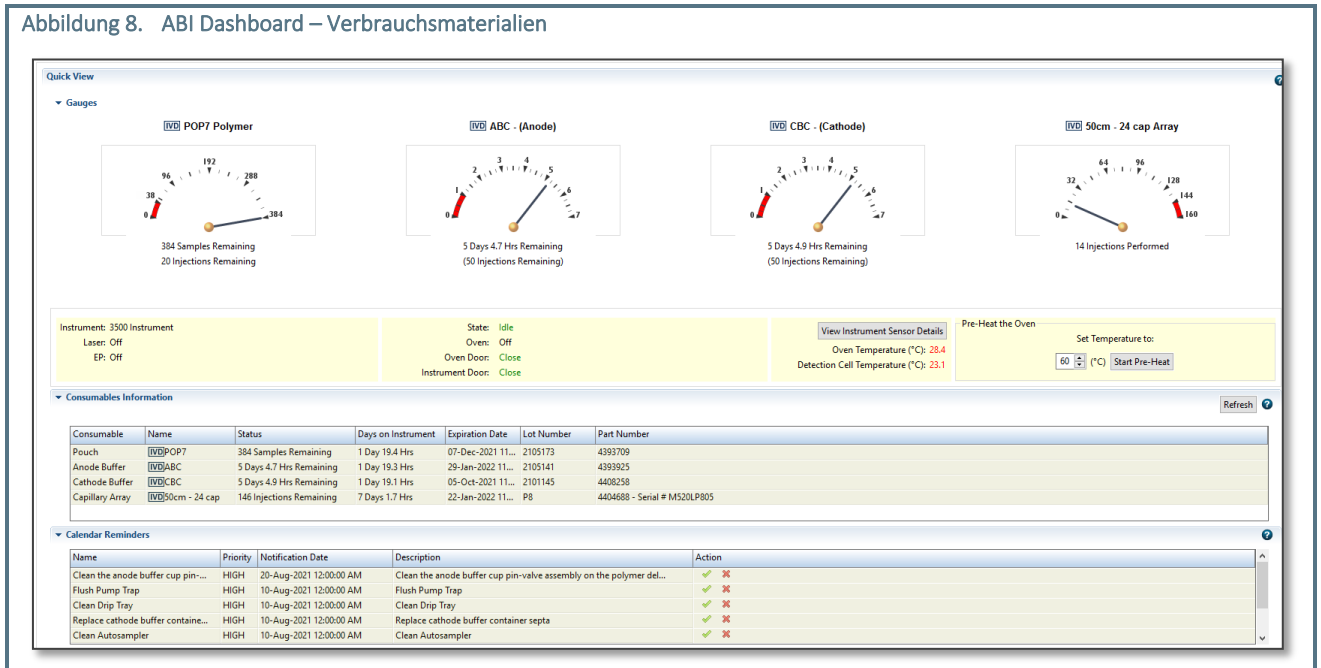
ACHTUNG: Die Dateinamenkonvention und die Ergebnisgruppe wie oben angegeben korrekt einrichten, um Datenanalysefehler zu vermeiden.



8.5. Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese

- 8.5.1. Den Status der Verbrauchsmaterialien des Instruments überprüfen.
- 8.5.1.1. Im ABI-Instrumenten-Dashboard auf **Refresh (Aktualisieren)** klicken, dann die verbleibende Instrumentenzeit und die Anzahl der für die Verbrauchsmaterialien durchgeführten Injektionen (Abbildung 8) überprüfen, um Folgendes zu verifizieren:
- 8.5.1.1.1. Ausreichende ABI-Reagenzvolumina für den/die Kapillarelektrophorese-Durchlauf/Durchläufe (CE),
- 8.5.1.1.2. Puffer, Polymer und Kapillaren haben die maximal zulässige Zeit auf dem Instrument nicht überschritten,
- 8.5.1.1.3. Die Anzahl der für jede Komponente verbleibenden Injektionen reicht für die Anzahl der Injektionen aus, die für den CE-Durchlauf bzw. die CE-Durchläufe erforderlich sind, und
- 8.5.1.1.4. Der verbleibende POP7 ist ausreichend für die Anzahl der Proben im Durchlauf bzw. den Durchläufen.
- 8.5.1.2. Wenn ein Verbrauchsmaterial abgelaufen ist oder ausgetauscht werden muss, die Anweisungen des Herstellers befolgen, um die erforderliche Wartung durchzuführen, bevor fortfahren.

Abbildung 8. ABI Dashboard – Verbrauchsmaterialien



- 8.5.1. Die mit der IdentiClone Dx IGH Software erstellte fertiggestellte ABI-Plattenbeschildung (CSV) importieren (siehe Abschnitt *Plattenbeschildung erstellen* in der Software-Gebrauchsanweisung).

ACHTUNG! Sicherstellen, dass eine LIVS-Datei erstellt wurde, als die Plattenbeschildung erstellt wurde. Wenn die LIVS-Datei fehlt, kann die IdentiClone Dx IGH Software die Ergebnisanalyse NICHT durchführen.

- 8.5.1.1. Auf **Create New Plate (Neue Platte erstellen)** klicken und einen Namen für die Platte eingeben.
 - 8.5.1.2. **96** als *Number of Wells (Anzahl der Wells)* auswählen.
 - 8.5.1.3. **Fragment (Fragment)** als *Plate Type (Plattentyp)* auswählen.
 - 8.5.1.4. **50 cm** als *Capillary Length (Kapillarlänge)* auswählen.
 - 8.5.1.5. **POP7** als *Polymer Type (Polymertyp)* auswählen.
 - 8.5.1.6. Auf **Assign Plate Contents (Platteninhalt zuweisen)** klicken.
 - 8.5.1.7. Auf **Import (Importieren)** klicken.
- 8.5.2. Sicherstellen, dass die korrekten Plattenbeschildungsattribute importiert wurden.
- 8.5.2.1. Die mit der IdentiClone Dx IGH Software erstellte ABI-Plattenbeschildung (CSV) öffnen.
 - 8.5.2.1.1. Sicherstellen, dass alle Proben- und Kontrollwells korrekt benannt sind und jedem Well der korrekte *Assay (Assay)*, die korrekte *File Name Convention (Dateinamenkonvention)* und die korrekte *Results Group (Ergebnisgruppe)* zugewiesen sind (siehe Abschnitte 8.4.5 bzw. 8.4.3).
 - 8.5.2.2. Wenn die Plattenbeschildung nicht mit der vorgesehenen Einrichtung übereinstimmt, eine neue ABI-Plattenbeschildungsdatei beginnend mit Abschnitt 8.5.1 erstellen.

ACHTUNG! Die Plattenbeschildung NICHT mit dem ABI Genanalysator modifizieren. Die Software verwenden, um die Plattenbeschildung zu ändern, um sicherzustellen, dass die zugehörige LIVS-Datei ebenfalls aktualisiert wird.

Wenn die Plattenbeschildungs- und LIVS-Dateien falsch ausgerichtet sind, kann die Software die Ergebnisanalyse NICHT durchführen.

- 8.5.2.3. Alle Wells auswählen, die keine Reaktion (Probe oder Kontrolle) enthalten, mit der rechten Maustaste klicken und **Delete (Löschen)** wählen, um die Erzeugung von Ergebnissen zu verhindern.

Anmerkung: Wenn dieser Schritt nicht ausgeführt wird, kann es zu SQ-Fehlern und/oder Schäden an der Kapillare kommen.

- 8.5.2.4. Auf **Save Plate (Platte speichern)** klicken und dann auf **Link Plate for Run (Platte für Durchlauf verknüpfen)** klicken.

- 8.5.3. Die Platte auf dem ABI 3500xL Dx oder ABI 3500xL Genetic Analyzer analysieren.
- 8.5.3.1. Die entsprechende Detektionsplatte (gemäß Abschnitt 8.3) gemäß den Anweisungen des Herstellers in das ABI-Instrument laden.
- 8.5.3.1.1. Sicherstellen, dass alle besetzten Wells in der Detektionsplatte frei von Luftblasen sind und sich der Inhalt am Boden des Wells befindet.
- 8.5.3.1.2. Sicherstellen, dass die Platte korrekt ausgerichtet ist, wenn sie im Instrument platziert wird.
- 8.5.3.1.3. Sicherstellen, dass die Plattenposition auf dem ABI-Instrument korrekt ausgewählt ist (Platte A bzw. Platte B).
- 8.5.3.2. Auf **Start Run (Durchlauf starten)** klicken.
- Das Instrument führt die Initialisierung durch. Wenn alle internen Qualitätskontrollprüfungen mit dem Status Pass (Bestanden) ausfallen, beginnt der Durchlauf.
- 8.5.3.2.1. Sicherstellen, dass der Durchlauf begonnen hat; sicherstellen, dass der Hintergrund des Probensatzes in der ersten Injektion auf der Plattenanzeige grün wird.
- 8.5.4. Durchlaufdaten für die Analyse vorbereiten
- 8.5.4.1. Nach dem ABI-Durchlauf überprüfen, ob der Durchlauf ohne Fehler abgeschlossen wurde, und zum Dateispeicherort navigieren, der die Durchlaufergebnisse im FSA-Format enthält.
- Der Speicherort der FSA-Datei wird von der *Results Group (Ergebnisgruppe)* bestimmt, die in Abschnitt 8.4.1, Abbildung 5, gespeichert ist.
- 8.5.4.1.1. Die FSA-Dateien an den gleichen Speicherort kopieren, der die von der Software generierten LIVS-Dateien enthält.
- Der Speicherort der LIVS-Datei wird während der *Platteneinrichtung* (siehe Software-Gebrauchsanweisung) zum Zeitpunkt des Speicherns der Plattenbeschickung festgelegt.
- 8.5.4.1.2. Mit der Datenanalyse mit der IdentiClone Dx IGH Software fortfahren, siehe Abschnitt *Result Analysis (Ergebnisanalyse)* in der entsprechenden Software-Gebrauchsanweisung.
- 8.5.4.2. Die Platte von der Basis des ABI-Instruments entfernen und entsorgen.

8.6. Qualitätskontrolle

Positive, negative und Nicht-Template-Kontrollen werden mit dem Kit geliefert und müssen bei jeder Assay-Durchführung mitgeführt werden. Die vom Assay generierten Daten werden von der IdentiClone Dx IGH Software interpretiert, wie in Abschnitt 9 beschrieben.

9. Interpretation der Ergebnisse

9.1. Software-Prüfpunkte

Die IdentiClone Dx *IGH* Software interpretiert die vom ABI-Instrument generierten Daten nach einer vorgegebenen Logik, die Validitätsprüfpunkte erfordert, um mit dem nachfolgenden Analyseschritt fortzufahren (siehe Abbildung 9). Der Probenklonalitätsstatus (d. h. das *Probenkennungs*-Ergebnis) erfordert mindestens ein Ergebnis aus einem gültigen Durchlauf für jeden Mastermix (d. h. *Probennamen*-Ergebnisse [*Sample Name*]).



9.1.1. Durchlaufkontrollen werden evaluiert, um die Gültigkeit des Durchlaufs zu bestimmen.

9.1.1.1. Ein gültiger Durchlaufstatus erfordert, dass die 3 Arten von Durchlaufkontrollen (Positiv, Negativ und Nicht-Template) gültige Ergebnisse erzeugen; andernfalls ist der Durchlaufstatus ungültig.

9.1.1.2. Alle *Probennamen*-Ergebnisse (*Sample Name*), die in einem ungültigen Durchlauf enthalten sind, werden automatisch als ungültig betrachtet und die Analyse wird nicht fortgesetzt.

ACHTUNG! Nur gültige Läufe, bei denen alle 3 Kontrollen gültig sein müssen, werden mit dem nächsten Schritt fortgesetzt.

9.1.2. *Probennamen*-Ergebnisse (*Sample Name*) eines gültigen Durchlaufs werden auf Gültigkeit (pro einzeltem Mastermix) bewertet.

9.1.2.1. Ein ungültiges *Probennamen*-Ergebnis (*Sample Name*) wird nicht mit der weiteren Analyse fortgesetzt (d. h. Mastermix-Klonalitätsstatus).

9.1.3. Gültige *Probennamen*-Ergebnisse (*Sample Name*) werden auf Klonalität (pro einzeltem Mastermix) bewertet.

9.1.3.1. Clonal (Klonal)

9.1.3.2. Non-Clonal (Nicht-klonal)

9.1.3.3. Indeterminate (Unbestimmt)

9.1.4. Gültige *Probennamen*-Ergebnisse (*Sample Name*) für alle 3 Mastermixe werden beurteilt, um den Probenklonalitätsstatus (*Probenkennungs*-Ergebnis (*Sample ID*)) zu bestimmen, siehe Abbildung 10.

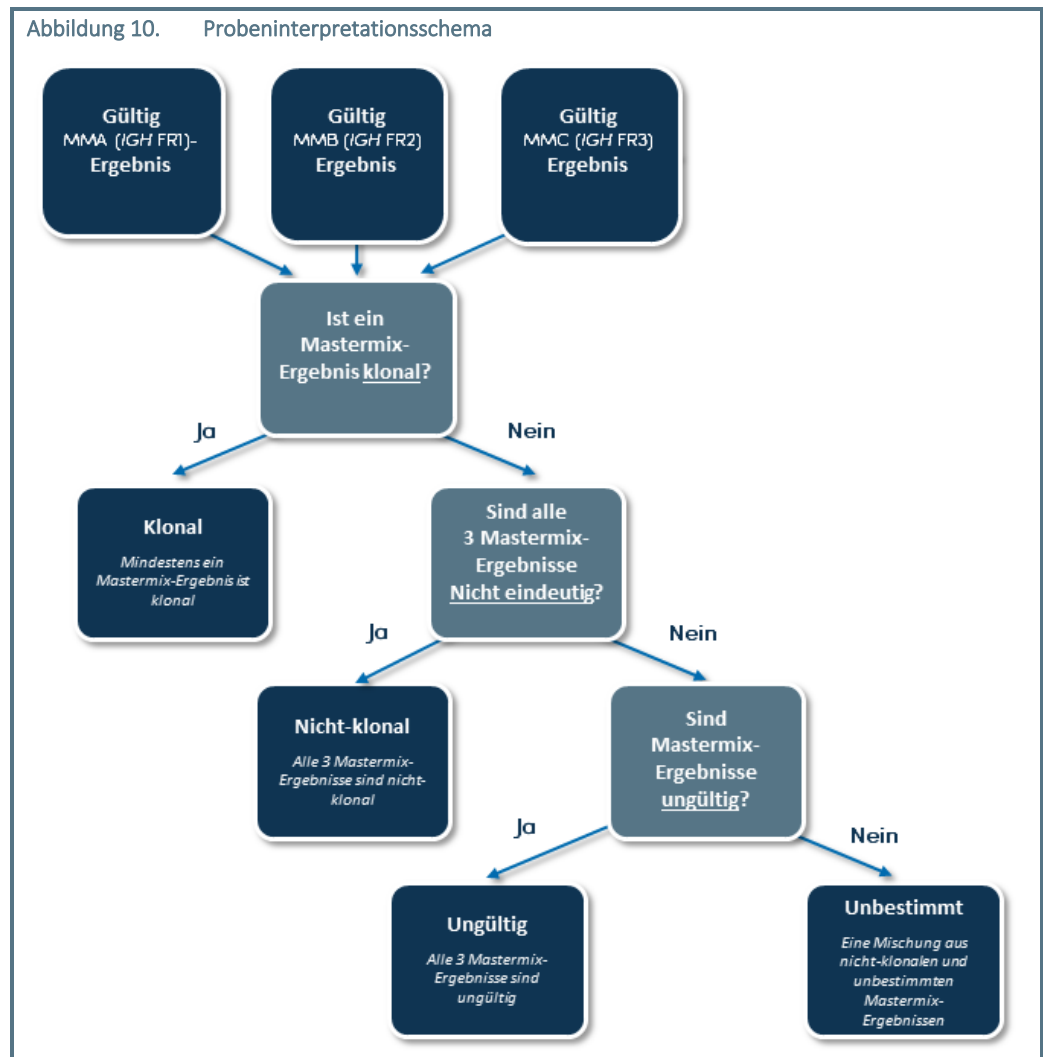
9.1.4.1. Wenn eines oder mehrere *Probennamen*- (*Sample Name*) (oder Proben-Mastermix-)Ergebnisse klonal sind, lautet das *Probenkennungs*-Ergebnis (*Sample ID*) **Clonal (klonal)**.

9.1.4.2. Wenn alle *Probennamen*- (*Sample Name*) (oder Proben-Mastermix-)Ergebnisse nicht-klonal sind, lautet das *Probenkennungs*-Ergebnis (*Sample ID*) **Non-Clonal (nicht-klonal)**.

9.1.4.3. Wenn die *Probennamen*- (*Sample Name*) (oder Proben-Mastermix-)Ergebnisse eine Mischung aus Unbestimmt- und Nicht-klonal-Ergebnissen (*Indeterminate* bzw. *Non-Clonal*) sind, ist das *Probenkennungs*-Ergebnis (*Sample ID*) **Indeterminate (Unbestimmt)**.

9.1.4.4. Wenn ein *Probennamen*- (*Sample Name*) oder Proben-Mastermix-Ergebnis ungültig ist und andere Ergebnisse nicht-klonal oder unbestimmt sind, ist das *Probenkennungs*-Ergebnis (*Sample ID*) **ungültig**.

- 9.1.4.4.1. Ungültige *Probennamen-* (*Sample Name*) (oder Proben-Mastermix-)Ergebnisse eines gültigen Durchlaufs können gemäß Abschnitt 10 erneut getestet werden, um den Klonalitätsstatus der *Sample ID* (*Probenkennung*) aufzulösen.



10. Erneute Tests, falls zutreffend

10.1. Ungültige Durchläufe

- 10.1.1. Ein Durchlauf, bei dem eine der Kontrollen die Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, ist ein **Invalid Run (Ungültiger Durchlauf)**. Den Durchlauf mit allen Proben, Positivkontrolle, Negativkontrolle und NTC wiederholen. Jeder Mastermix wird unabhängig voneinander analysiert.
- 10.1.2. Den Durchlauf gemäß der zugehörigen Software-Gebrauchsanweisung wiederholen, basierend auf dem/den Fehlercode(s), der/die im Durchlaufbericht der IdentiClone Dx IGH Software aufgeführt ist/sind.

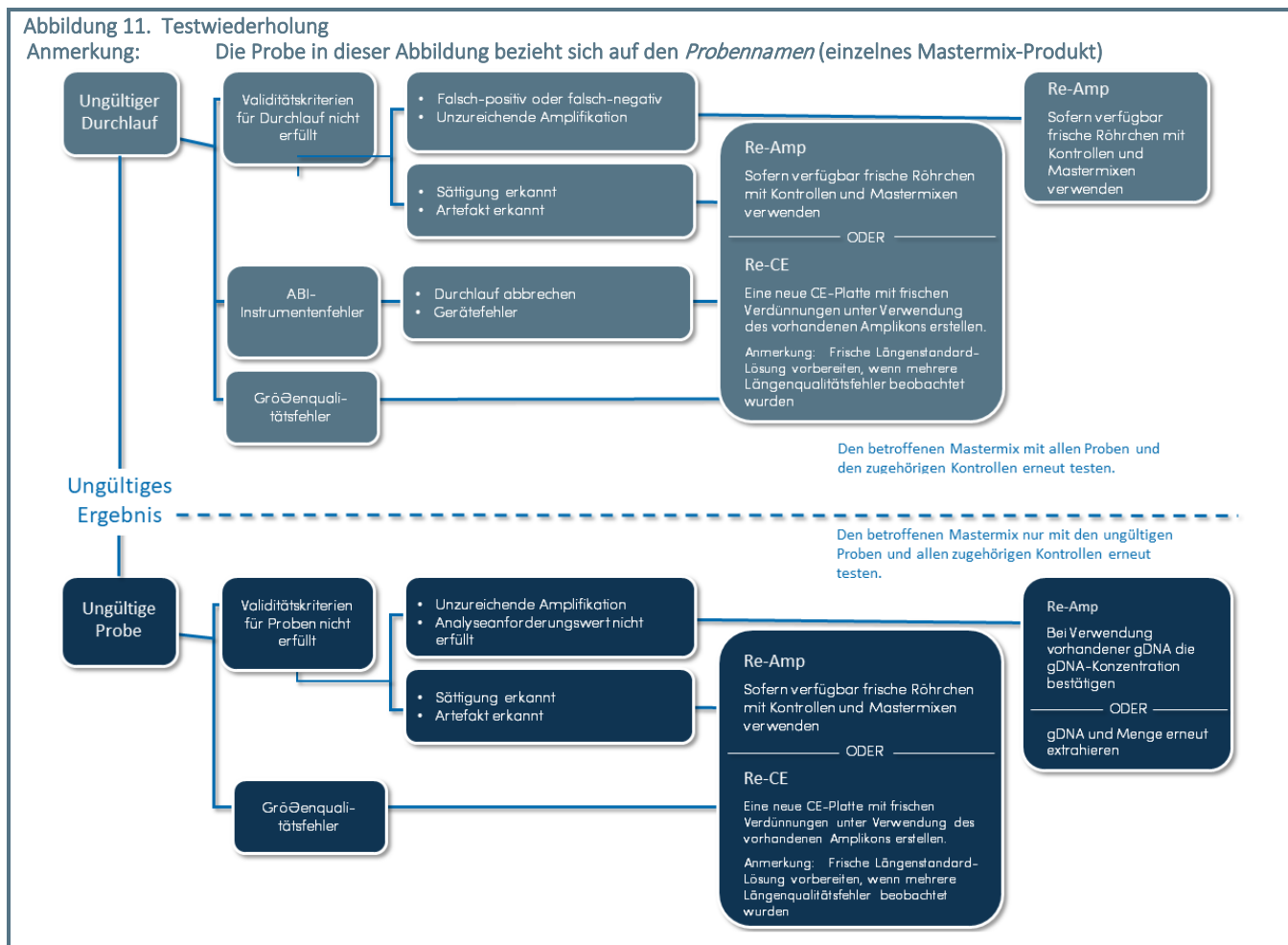
10.2. Ungültige Proben in einem gültigen Durchlauf

Ungültige *Probename*-Ergebnisse (*Sample Name*), die aus einem gültigen Durchlauf generiert wurden, müssen erneut getestet werden, wenn die *Probename*-Ergebnisse (*Sample Name*) der anderen Mastermixe Non-Clonal (Nicht-klonal) und/oder Indeterminate (Unbestimmt) sind; andernfalls ist kein erneuter Test erforderlich. Siehe Abbildung 11 für die Hierarchie der Wiederholungstests.

- 10.2.1. Wenn die Ergebnisse eines der Mastermixe **Clonal (klonal)** sind (innerhalb eines gültigen Durchlaufs), ist kein Wiederholungstest erforderlich.
- 10.2.2. Wenn die Ergebnisse aller Mastermixe **Non-Clonal (Nicht-klonal)** sind (innerhalb gültiger Läufe), ist kein Wiederholungstest erforderlich.
- 10.2.3. Wenn die Ergebnisse aller Mastermixe **Non-Clonal (Nicht-klonal)**, **Indeterminate (Unbestimmt)** und **Invalid (Ungültig)** sind, die *Sample Names (Probennamen)* mit dem Ergebnis Invalid (Ungültig) und die zugehörigen Durchlaufkontrollen gemäß dem Fehlercode erneut testen (siehe Abbildung 11).

10.3. Fehlerbeschreibungen und Testwiederholung

Bis zu vier Wiederholungstestereignisse sind zulässig, wenn die Fehler auf eine andere Ursache zurückzuführen sind (d. h. 1. Runde ⇒ *Sample Name (Probennamen)*-Ergebnis Invalid (Ungültig) aufgrund eines ungültigen Durchlaufs; 2. Runde ⇒ *Sample Name (Probennamen)*-Ergebnis Invalid (Ungültig) aufgrund eines Artefakts; 3. Runde ⇒ *Sample Name (Probennamen)*-Ergebnis Invalid (Ungültig) aufgrund einer Sättigung; 4. Runde ⇒ *Sample Name (Probennamen)*-Ergebnis Invalid (Ungültig) aufgrund eines SQ-Fehlers).



11. Verfahrenseinschränkungen

- Nachweisgrenze: 2,5 % B-Zell-Klonalität
- Mit diesem Assay können nicht 100 % der klonalen Zellpopulationen identifiziert werden.
- Die Ergebnisse molekularer Klonalitätsassays müssen immer unter Berücksichtigung klinischer, histologischer und immunphänotypischer Daten interpretiert werden.
- PCR-basierte Assays werden vom Abbau der DNA oder der Hemmung einer PCR-Amplifikation durch EDTA, Heparin und andere Wirkstoffe beeinflusst.

12. Leistungseigenschaften

12.1. Proben- und Probenvalidierungen – Stabilität der Proben

- 12.1.1. Diese Studie liefert eine Validitätsbewertung des Probentyps zur Unterstützung der vorgeschlagenen Angaben in der Gebrauchsanweisung; das Prüfprodukt ist für mit EDTA antikoagulierte peripheres Blut validiert. Der Zweck dieser Studie ist die Bestimmung der Stabilität von peripherem Blut, das mit EDTA-Probentyp für den IdentiClone Dx *IGH* Assay antikoaguliert wurde, indem objektive Nachweise aus Tests von Proben vor und nach verschiedenen Lagerbedingungen mit dem Prüfprodukt im Vergleich zu probenspezifischen Baseline-Testergebnissen geliefert werden. Diese Studie wurde an 2 Replikaten von 15 Proben (10 B-Zellen, klonal/positiv, 5 nicht-klonal/negativ) durchgeführt, die zu 5 verschiedenen Zeitpunkten mit 1 Reagenziencharge auf mehreren ABI 3500xL Dx Instrumenten von mehreren Bedienern über mehrere Tage getestet wurden. Zu den getesteten Zeitpunkten gehören:
- Timepoint-0: Baseline
 - Timepoint-1: Gekühlt (2–8 °C) 5 Tage lang
 - Timepoint-2: Gekühlt (2–8 °C) 7 Tage lang
 - Timepoint-3: Raumtemperatur (15–30 °C) 5 Tage lang
 - Timepoint-4: Raumtemperatur (15–30 °C) 7 Tage lang
- 12.1.2. Tabelle 8 enthält das Testergebnis für jedes getestete Replikat der 15 Proben. Alle Proben-testergebnisse (2 Replikate für jede der 15 Proben) waren gültig (100,0 % Probenvaliditätsrate, 30/30). Beide Replikate jeder nicht-klonalen und klonalen Probe generierten die erwarteten Ergebnisse, was auf eine Übereinstimmung von 100,0 % zwischen Timepoint-0 und Timepoint-1, Timepoint-0 und Timepoint-2, Timepoint-0 und Timepoint-3 und Timepoint-0 und Timepoint-4 hinweist.

Tabelle 8. Zusammenfassung der Ergebnisse des Klonalitätsstatus

Teilnehmer-ID	Replikat	Klonalitätsstatus				
		Zeitpunkt 0	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Zeitpunkt 3	Zeitpunkt 4
CS189	1	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)
	2	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)
030723-1	1	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)
	2	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)
030723-2	1	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)
	2	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)
041223-4	1	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)
	2	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)
CS231	1	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)
	2	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	Non-Clonal (Nicht-klonal)
CS201	1	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
	2	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
DLS08	1	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
	2	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)

Tabelle 8. Zusammenfassung der Ergebnisse des Klonalitätsstatus

Teilnehmer-ID	Replik	Klonalitätsstatus				
		Zeitpunkt 0	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Zeitpunkt 3	Zeitpunkt 4
DLS09	1	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
	2	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
DLS10	1	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
	2	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
DLS11	1	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
	2	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
DLS12	1	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
	2	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
DLS13	1	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
	2	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
DLS14	1	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
	2	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
DLS15	1	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
	2	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
DLS16	1	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)
	2	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)	Clonal (Klonal)

- 12.1.2.1. Die Ergebnisse dieser Studie haben ergeben, dass die Stabilität des mit EDTA-Probentyp antikoagulierten peripheren Bluts bei Lagerung bei 2 °C bis 8 °C oder Raumtemperatur (15 °C bis 30 °C) für die Verwendung mit dem IdentiClone Dx *IGH* Assay ≥ 5 Tage beträgt.

12.2. Klinischer Grenzwert

- 12.2.1. Diese Studie führt eine vergleichende Beurteilung der historischen Daten aus dem IdentiClone Dx *IGH* Assay mit klinischen Proben durch, die zuvor als positiv für klonale *IGH*-Genumlagerungen identifiziert wurden, um den klinischen Grenzwert des relativen Peak-Verhältnisses (RPR) zu ermitteln. Die beiden ausgewählten Referenzmethoden umfassen 1) einen handelsüblichen IVD-Assay (zum Zeitpunkt der Studie), der eine Sequenzierung der nächsten Generation (NGS) zum Nachweis von klonalen *IGH*-Genumlagerungen (Referenzassay) anwendet, mit einem Verwendungszweck ähnlich dem Prüfprodukt, dem IdentiClone Dx *IGH* Assay und 2) die klinische Diagnose basierend auf den ICD-10-Codes für die lymphoproliferative B-Zell-Erkrankung (zugewiesenes klonales) oder Gesund (zugewiesenes nicht-klonales).
- 12.2.2. Insgesamt wurden die Ergebnisse von 170 Proben bewertet. Der erste Datensatz umfasste 114 Proben, die sowohl mit dem Referenzassay (IVD) als auch mit dem IdentiClone Dx *IGH* Assay (IUO) ein gültiges Ergebnis generierten; diese wurden auf prozentuale (%) Übereinstimmung der von den beiden Assays generierten Ergebnisse bewertet. Die Bewertung erfolgte mit 3 verschiedenen RPR-Werten als Grenzwert: 2,0, 3,0 und 4,0. Der zweite Datensatz umfasste 145 Proben, die ein gültiges Ergebnis mit dem IdentiClone Dx *IGH* Assay in Verbindung mit einer bekannten klinischen Diagnose auf der Grundlage des ICD-10-Codes oder des gesunden Status generierten. Dieser Datensatz wurde auf die prozentuale Übereinstimmung zwischen den 2 Klassifikationen (Klonal oder Nicht-Klonal) mit einem Grenzwert von 3,0 bewertet. Zur Beurteilung wurden verschiedene Untergruppen von Testergebnissen aus den 170 Proben verwendet, da einige Proben ungültige Ergebnisse mit dem IdentiClone Dx *IGH* Assay (IUO) oder dem Referenzassay (IVD) generierten oder weil keine klinischen Diagnoseinformationen (ICD-10-Code oder gesunder Status) verfügbar waren.
- 12.2.2.1. Der erste Datensatz aus 114 Proben verglich die mit dem IdentiClone Dx *IGH* Assay erzielten Klonalitätsergebnisse mit dem Referenzassay, wobei der RPR-Wert auf $\geq 3,0$ als Grenzwert eingestellt wurde. OPA, PPA und NPA gegenüber dem Referenzassay betragen 92,1 %, 93,8 % bzw. 87,9 %. Der untere Grenzwert des 95%-KI, die mit der zweiseitigen Bewertungsmethode für PPA und NPA berechnet wurde, betrug 86,4 % bzw. 72,7 %. (Tabelle 9) Um die Robustheit eines RPR-Werts für den klinischen Grenzwert von 3,0 zu gewährleisten, wurden dieselben Daten anhand von RPR-Werten sowohl unterhalb als auch oberhalb eines RPR = 3,0 (d. h. RPR = 2,0 und RPR = 4,0) neu analysiert. Der auf $\geq 3,0$ eingestellte RPR-Wert für den klinischen Grenzwert erwies sich als optimal, da er den besten prozentualen Übereinstimmungswert zwischen dem Prüfprodukt und dem Referenzassay ergab, wobei der größere Abstand vom RPR-Wert sofort niedriger eingestuft wurde.

Tabelle 9. Bewertung gegenüber dem Referenzassay (IVD)

IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay (IUO)	Referenztest (IVD)		Gesamt
	Klonal	Nicht-klonal	
Klonal	76	4	80
Nicht-klonal	5	29	34
Gesamt	81	33	114
OPA	92,1 %		
PPA	93,8 % (95-%-KI: 86,4 %–97,3 %)		
NPA	87,9 % (95-%-KI: 72,7 %–95,2 %)		

- 12.2.2.2. Der zweite Datensatz bestand aus 145 Proben und verglich eine bekannte klinische Diagnose (ICD-10-Code oder gesunder Status) mit den mit dem IdentiClone Dx *IGH* Assay generierten Klonalitätsergebnissen unter Verwendung eines RPR-Werts von $\geq 3,0$ als Grenzwert. Die daraus resultierenden OPA, PPA und NPA im Vergleich zur klinischen Diagnose betragen 91,7 %, 92,8 % bzw. 90,3 %. Das mit der zweiseitigen Bewertungsmethode für PPA und NPA berechnete LL-95-%-KI betrug 85,1 % bzw. 80,5 %. (Tabelle 10)

Tabelle 10. Bewertung mit klinischer Diagnose als Referenzmethode

IdentiClone Dx <i>IGH</i> Assay (IUO)	Klinische Diagnose (Referenz)		Gesamt
	Lymphoproliferative B-Zell-Erkrankung	Gesund	
Klonal	77	6	83
Nicht-klonal	6	56	62
Gesamt	83	62	145
OPA	91,7 %		
PPA	92,8 % (95-%-KI: 85,1–96,6 %)		
NPA	90,3 % (95-%-KI: 80,5–95,5 %)		

- 12.2.3. Die mit dem IdentiClone Dx *IGH* Assay erzielten klinischen Probenestergenergebnisse zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den Referenzmethoden, wobei der RPR-Wert des klinischen Grenzwerts auf $\geq 3,0$ gesetzt wird, was auch der RPR-Grenzwert zur Bestimmung der Klonalität ist. Die LL von 95 % KI für PPA und NPA lag beide über 70 % im Vergleich zum NGS-basierten Referenzassay, einem handelsüblichen IVD-Assay oder im Vergleich zur klinischen Diagnose.

12.3. Analytische Empfindlichkeit Leerwertgrenze (LoB)

- 12.3.1. In dieser Studie wird die Leerwertgrenze (Limit of Blank, LoB) für den IdentiClone Dx *IGH* Assay ermittelt, indem 20 Proben von nicht-klonalen Spendern (jeweils 3 Replikate) mit 2 Reagenzienchargen auf mehreren ABI 3500xL Dx Genetic Analyzern von mehreren Bedienern über mehrere Tage getestet werden (60 Datenpunkte pro Mastermix, pro Reagenziencharge).
- 12.3.2. Alle (100 %) der getesteten LoB-Testpanelproben waren nicht-klonal (negativ) mit einem RPR $< 3,0$. Das höchste beobachtete RPR (2,9) wurde durch Testung einer negativen klinischen Probe mit MMA, Reagenziencharge 2, generiert. Für jede Reagenziencharge wurden 60 Testergebnisse vom RPR eingestuft. Das 95. Perzentil entspricht dem 57,5. Rang; daher wurde der Durchschnitt des 57. und 58. RPR für jeden Mastermix für jede Reagenziencharge berechnet. (Tabelle 11) Zusammenfassend wird unter Verwendung des konservativen Ansatzes die Gesamt-LoB des Assays als RPR von 2,0 bestimmt.

Tabelle 11. Zusammenfassung der LoB-Ergebnisse

Reagenziencharge	MM	Rang	RPR	Durchschnittliches RPR der Einstufungen 57 + 58
1	A	57	1,7	1,8
		58	1,8	
	B	57	1,9	2,0
		58	2,0	
	C	57	1,7	1,7
		58	1,7	

Tabelle 11. Zusammenfassung der LoB-Ergebnisse

Reagenziencharge	MM	Rang	RPR	Durchschnittliches RPR der Einstufungen 57 + 58
2	A	57	1,8	1,9
		58	1,9	
	B	57	1,8	1,9
		58	1,9	
	C	57	1,8	1,9
		58	1,9	

12.4. Analytische Empfindlichkeit Nachweisgrenze (LoD)

- 12.4.1. Diese Studie legt eine Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) für den IdentiClone Dx *IGH* Assay fest, indem sie objektive Nachweise aus Ergebnissen liefert, die mit klinischer gDNA aus peripherem Blut gewonnen wurden, die die *IGH*-Clans (I, II und III) repräsentiert, die mit gDNA aus gepooltem peripherem Blut (PPB) von gesunden Spendern verdünnt wurden.
- 12.4.2. Insgesamt 20 Proben (10 gesunde Spender und 10 Spender mit Verdacht auf B-Zell-Lymphoproliferationen mit nicht-klonalem Status) umfassten die PBB, die zur Herstellung der 7 Verdünnungen von gDNA für jede *IGH*-Clan (I/II/III) verwendet wurde, die für Tests mit dem Prüfprodukt verwendet wurden: 0,0 %, 0,3 %, 1,0 %, 3,0 % und 10,0 %. Die resultierenden RPR-Werte von Proben, die ein klonales Ergebnis generierten, wurden anhand der Tabelle der Klonalitätsstandards (Tabelle 12) verifiziert, die die Korrelation zwischen dem für jeden Mastermix generierten RPR-Wert und jeder *IGH*-Clan und dem Prozentwert der Verdünnung der klonalen *IGH*-Umlagerung liefert. Mit dem IdentiClone Dx *IGH* Assay wurden für jede *IGH*-Clan bei jeder Verdünnung und jeder Reagenziencharge mindestens 20 gültige Ergebnisse erzielt. Diese Studie wurde mit 2 Reagenzienchargen auf mehreren ABI3500XL Dx Instrumenten von mehreren Bedienern über mehrere Tage durchgeführt.

Tabelle 12. Tabelle der Klonalitätsstandards

% Verdünnung oder % Klonalität	Mastermix-RPR-Werte								
	<i>IGH</i> -Clan I ^A			<i>IGH</i> -Clan II ^B		<i>IGH</i> -Clan III ^C			
	MMA	MMB	MMC	MMA	MMB	MMA	MMB	MMC	
25 %	65,2	121,9	131,5	91,2	119,5	149,7	169,1	162,8	
10 %	52,6	96,0	92,5	26,5	40,5	53,0	57,3	79,9	
5 %	30,4	48,0	50,4	12,1	18,1	28,7	31,8	34,2	
2,5 %	14,9	25,7	29,9	6,3	8,6	11,8	11,7	15,9	
1,0 %	5,1	10,8	13,3	2,3	3,0	3,9	4,8	7,1	
0,5 %	2,9	4,7	5,9	1,3	1,6	1,8	2,0	3,3	
0,25 %	1,4	2,3	3,1	1,3	1,3	1,4	1,3	1,8	
0,1 %	1,4	1,4	1,4	1,3	1,4	1,3	1,5	1,5	
0,05 %	1,3	1,4	1,3	1,5	1,3	1,2	1,2	1,4	

^AIVS-0019-Zelllinie wird als klonaler Standard für die Schätzung der Klonalität von *IGH*-Clan I verwendet

^BIVS-0002-Zelllinie wird als klonaler Standard für die Schätzung der Klonalität von *IGH*-Clan II verwendet

^CIVS-0003-Zelllinie wird als klonaler Standard für die Schätzung der Klonalität von *IGH*-Clan III verwendet

- 12.4.2.1. Die 1,0%ige Verdünnung von *IGH*-Clan I amplifiziert mit Mastermix C (Reagenzcharge 1 – 95 % positiv, durchschnittliches RPR = 4,1) und die 3,0%ige *IGH*-Clan 1 Verdünnung mit MMA, MMB und MMC (Reagenzcharge 2 MMA – 100 % positiv, durchschnittliches RPR = 9,9; Reagenzcharge 2 MMB – 100 % positiv, durchschnittliches RPR = 12,8; Reagenzcharge 2 MMC – 100 % positiv, durchschnittliches RPR = 13,2) sind die niedrigstprozentigen Verdünnungen mit einem positiven Prozentwert von ≥ 95 % pro Reagenziencharge des Mastermix. (Tabelle 13 und Tabelle 14). Da die LoD auf der Grundlage der schlechtesten Leistung ermittelt werden soll, wurde das Ergebnis der höherprozentigen Verdünnungen aus den beiden Reagenzienchargen (RPR-Werte, die durch die 3,0%ige-Verdünnung von *IGH*-Clan I mit Reagenzcharge 2 generiert wurden) zur Bewertung ausgewählt. Die RPR-Werte, die durch die Verdünnung von 3,0 % *IGH*-Clan I mit jedem Mastermix generiert wurden, wurden anhand der Tabelle der klonalen Standards bewertet, um die prozentuale Verdünnung in die prozentuale Klonalität umzuwandeln.

- 12.4.2.1.1. Gemäß der Tabelle der klonalen Standards liegen die MMA-, MMB- und MMC-RPR-Werte innerhalb des Bereichs, der dem Klonalitätsbereich von 1,0 % bis 2,5 % für MMA (RPR-Bereich = 5,1–14,9), 1–2,5 % für MMB (RPR-Bereich = 10,8–26,7) und 0,5–1 % für MMC (RPR-Wertebereich = 5,9–13,3) entspricht. Unter Anwendung eines konservativen Ansatzes wurde die LoD für *IGH*-Clan I als 2,5 % Klonalität bestimmt.
- 12.4.2.2. Die mit MMB amplifizierte 3,0%ige-Verdünnung von *IGH*-Clan 2 ist die niedrigstprozentige Verdünnung, bei der positive Prozentwerte von ≥ 95 % beobachtet wurde (Reagenziencharge – 100 % positiv, durchschnittliches RPR = 8,5; Reagenzcharge 2 – 100 % positiv, durchschnittliches RPR = 8,3). Die RPR-Werte von 8,5 und 8,3 für MMB korrelieren mit einer Klonalität von 1,0 % bis 2,5 % gemäß der Tabelle der klonalen Standards. Daher wird die LoD für *IGH*-Clan 2 als 2,5 % Klonalität bestimmt.
- 12.4.2.3. Die niedrigstprozentige Verdünnung, bei der der Prozentsatz positiv von ≥ 95 % für *IGH*-Clan III beobachtet wurde, ist die 1,0%ige Verdünnung mit MMC (100 % positiv, durchschnittliches RPR = 6,3) mit beiden Reagenzienchargen. Unter Verwendung der Klonalitätsstandardtabelle liegt ein RPR von 6,3 innerhalb eines Bereichs von RPR-Werten, die einem Bereich von 0,5 % bis 1,0 % Klonalität entsprechen. Daher wird die LoD für *IGH*-Clan III als 1,0 % Klonalität bestimmt.
- 12.4.3. Da die LoD für *IGH*-Clan I, II und III als 2,5 %, 2,5 % und 1 % Klonalität bestimmt wurde und ein konservativer Ansatz angewendet wurde, wird die LoD des Assays insgesamt als 2,5 % bestimmt.

Tabelle 13. Zusammenfassung der LoD-Ergebnisse für Reagenziencharge 1

Clan	% Verdünnung	MMA			MMB			MMC		
		Valide N	% pos	Durchschn. RPR	Valide N	% pos	Durchschn. RPR	Valide N	% pos	Durchschn. RPR
k. A.	0,0	19	0	1,4	20	0	1,4	20	0	1,4
I	0,1	20	0	1,4	20	0	1,4	20	0	1,4
	0,3	20	0	1,3	20	0	1,4	20	0	1,3
	1,0	18	50,0	3,0	19	89,5	3,8	20	95,0	4,1
	3,0	20	100,0	10,2	20	100,0	13,3	20	100,0	12,9
	10,0	19	100,0	40,3	20	100,0	52,7	20	100,0	45,9
	30,0	20	100,0	91,4	20	100,0	144,5	20	100,0	111,2
II	0,1	20	0	1,4	20	0	1,5	20	0	1,4
	0,3	20	0	1,3	20	0	1,6	20	0	1,4
	1,0	19	0	1,3	20	50,0	2,9	20	0	1,3
	3,0	19	0	1,9	20	100,0	8,5	20	0	1,4
	10,0	20	100,0	6,9	20	100,0	30,7	19	0	1,3
	30,0	20	100,0	28,8	20	100,0	99	20	0	1,3
III	0,1	20	0	1,4	20	0	1,4	20	0	1,3
	0,3	20	0	2,0	20	0	1,5	20	0	1,9
	1,0	20	100,0	5,8	20	95,0	4,4	19	100,0	6,3
	3,0	20	100,0	17,5	19	100,0	14	20	100,0	19,2
	10,0	20	100,0	59,3	20	100,0	52,8	20	100,0	67,6
	30,0	20	100,0	113,9	20	100,0	132,5	20	100,0	147,4

Tabelle 14. Zusammenfassung der LoD-Ergebnisse für Reagenziencharge 2

IGH-Clan	% Verdünnung	MMA				MMB				MMC			
		Valide N	n klonal	% pos	Durchschn. RPR	Valide N	n klonal	% pos	Durchschn. RPR	Valide N	n klonal	% pos	Durchschn. RPR
k. A.	0,0	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,4
I	0,1	20	0	0,0	1,3	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,3
	0,3	20	0	0,0	1,3	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,5
	1,0	20	10	50,0	3,0	19	16	84,2	3,8	19	17	89,5	3,9
	3,0	18	18	100,0	9,9	20	20	100,0	12,8	20	20	100,0	13,2
	10,0	20	20	100,0	37,4	20	20	100,0	53,7	19	19	100,0	46,3
	30,0	20	20	100,0	90,4	20	20	100,0	118,7	20	20	100,0	114,9
II	0,1	20	0	0,0	1,3	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,4
	0,3	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,6	20	0	0,0	1,4
	1,0	20	0	0,0	1,3	20	10	50,0	3,1	20	0	0,0	1,4
	3,0	20	0	0,0	1,7	20	20	100,0	8,3	20	0	0,0	1,4
	10,0	20	20	100,0	6,5	20	20	100,0	28,9	19	0	0,0	1,3
	30,0	20	20	100,0	28,3	20	20	100,0	82,8	20	0	0,0	1,4
III	0,1	20	0	0,0	1,4	20	0	0,0	1,3	20	0	0,0	1,4
	0,3	20	0	0,0	2,1	20	0	0,0	1,7	20	0	0,0	2,1
	1,0	19	19	100,0	6,1	19	18	94,7	5,2	20	20	100,0	6,3
	3,0	20	20	100,0	18,7	20	20	100,0	14,6	20	20	100,0	18,9
	10,0	19	19	100,0	65,9	20	20	100,0	54,3	20	20	100,0	63,7
	30,0	20	20	100,0	133,9	20	20	100,0	125,7	20	20	100,0	131,5

12.5. Analytische Spezifität: Störsubstanzen

- 12.5.1. Dieses Studiendesign basierte auf den CLSI-Normen EP07-A3 und EP37-Ed1 und umfasst die Bewertung der Wirkung von 6 verschiedenen, potenziell störenden Substanzen, wenn sie in mit dem IdentiClone Dx IGH Assay getesteten Proben vorhanden sind. Die getesteten Substanzen waren Bilirubin, Hämoglobin, Cholesterin, EDTA, Triglycerid und 70%iges Ethanol, das nach der Extraktion in gDNA-Proben gespikt wurde, da die potenzielle Einführung dieser Substanz in den Assay-Arbeitsablauf nach der gDNA-Extraktion erfolgen würde. Andernfalls wurden die anderen Substanzen vor der gDNA-Extraktion frischen PB-Proben zugesetzt.
- 12.5.2. In dieser Studie wurden insgesamt 24 Proben von frischem (niemals eingefrorenem) peripheren Blut verwendet, das in EDTA von gesunden Spendern (negativ/nicht-klonal) oder Spendern mit diagnostiziertem B-Zell-Lymphoproliferationssyndrom (positiv/klonal) antikoaguliert und bis zu 7 Tage vor der gDNA-Extraktion bei 2 °C bis 8 °C gelagert wurde. Jede Probe wurde doppelt, ungespikt oder gespikt getestet, bestehend aus 10 klonalen Proben pro Substanz und 5 nicht-klonalen Proben pro Substanz. Diese Studie wurde mit 2 Reagenzienchargen auf mehreren ABI3500xL Dx Instrumenten von mehreren Bedienern über mehrere Tage durchgeführt.
- 12.5.3. Die Ergebnisse dieser Studie gehen aus Tabelle 15 hervor und zeigen bei den getesteten Konzentrationen keine Störung durch die 6 Substanzen. Alle Proben generierten den erwarteten Klonalitätsstatus (klonal oder nicht-klonal), wenn sie ungespikt oder gespikt getestet wurden. Jede Störsubstanz wurde mit 5 nicht-klonalen und 10 klonalen Proben getestet, mit Ausnahme der Substanz Cholesterin. Cholesterin wurde mit 5 nicht-klonalen und 11 klonalen Proben getestet und jede ungespikte und gespikte Probe wurde doppelt getestet. Insgesamt wurden 30 Klonalitätsergebnisse für jede Störsubstanz vor und nach dem Spiken bestimmt, mit Ausnahme von Cholesterin (32 abschließende Ergebnisse). Alle Ergebnisse des Klonalitätsstatus, die mit gespikten Proben erzielt wurden, stimmten mit den Ergebnissen des Klonalitätsstatus überein, die mit den entsprechenden ungespikten Proben erzeugt wurden, was zeigt, dass die getesteten Substanzen bei der getesteten Konzentration keine Störung des Assays verursachten. Der untere Grenzwert des 95%-Konfidenzintervalls für die prozentuale Übereinstimmung für jede Störsubstanz lag bei oder über 88,4 %. (Tabelle 15)

Tabelle 15. Prozentuale Übereinstimmung des endgültigen Ergebnisses, ungespikt im Vergleich zur Störsubstanz

Störsubstanz (Endgültige Testkonzentration)	Probenart	N (Nein)	Testergebnisse gesamt		Konkordantes Gesamtergebnis ²	% Übereinstimmung (95%-KI) ³
			Ungespikt	Gespikt		
Cholesterin (4,0 mg/ml)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	5	32	32	32	100,0 %
	Clonal (Klonal)	11				(89,1–100,0)
Triglycerid (15,0 mg/ml)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	5	30	30	30	100,0 %
	Clonal (Klonal)	10				(88,4–100,0)
Hämoglobin 100 mg/ml)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	5	30	30	30	100,0 %
	Clonal (Klonal)	10				(88,4–100,0)
Bilirubin (0,4 mg/ml)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	5	30	30	30	100,0 %
	Clonal (Klonal)	10				(88,4–100,0)
EDTA (5,4 mg/ml)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	5	30	30	30	100,0 %
	Clonal (Klonal)	10				(88,4–100,0)
70%iges Ethanol (10 Vol.-%)	Non-Clonal (Nicht-klonal)	5	30	30	30	100,0 %
	Clonal (Klonal)	10				(88,4–100,0)

¹ Zwei Replikate pro Probe, die vor und nach dem Spiken mit Störsubstanzen getestet wurden.

² Gespikte Testergebnisse, die mit dem entsprechenden ungespikten Testergebnis aus denselben Proben übereinstimmen.

³ Exakte Methode (nach Clopper-Pearson).

12.6. Analytische Spezifität: Verschleppung/Kreuzkontamination

- 12.6.1. In dieser Studie wurde die Verschleppungs- und Kreuzkontaminationsrate während des Arbeitsablaufs des IdentiClone Dx *IGH* Assay bei der PCR-Einrichtung und der Analyse der Kapillarelektrophoresefragmente bewertet. Die Tests wurden an 106 simulierten negativen Proben für Verschleppung und 126 simulierten negativen Proben für Kreuzkontamination durchgeführt. Angesetzte negative (nicht-klonale) Proben wurden mit 100%iger IVS-0000 polyklonalen Kontrolle vorbereitet; angesetzte positive (klonale) Proben wurden mit 100%iger DNA der IVS-0019 klonalen Kontrolle vorbereitet.
- 12.6.2. Das Plattenlayout bestand aus abwechselnden positiven und negativen Proben in einem Schachbrettmuster, das darauf ausgelegt war, das Auftreten von Verschleppungen und Kreuzkontamination zu maximieren. Diese Proben wurden mit Mastermix A (MMA) amplifiziert, der als repräsentativer Mastermix ausgewählt wurde, da Kontamination vom Amplikonsignal und nicht vom Mastermix abhängig ist. Die Tests wurden auf mehreren Platten mit wechselnden Probenlayouts auf 2 verschiedenen ABI 3500xL Dx Genetic Analyzern von 1 Bediener mit 1 Reagenziencharge über mehrere Tage durchgeführt.
- 12.6.3. Vor der Durchführung einer Kapillarelektrophorese-Fragmentierung an Testproben wurde eine Basislinie erstellt, indem eine Platte aus einer Liz/HIDI-Lösung durch das Instrument analysiert wurde, um zu bestätigen, dass kein kontaminierendes Signal aus früheren Untersuchungen vorhanden war. Die Verschleppung wurde anhand von Daten aus negativen Proben von Platten mit demselben Probenlayout (insgesamt 10 Injektionen, 106 kombinierte negative Proben) beurteilt. Alle 105 negativen Probenergebnisse, die für die Verschleppungsbewertung qualifiziert waren, generierten nicht-klonale Ergebnisse, und der Prozentsatz der falschen Ergebnisse aufgrund einer Verschleppung beträgt 0,0 % (0/105) mit einem 95 % niedrigeren KI von 96,5 %. Die Kreuzkontamination wurde anhand von Daten evaluiert, die aus negativen Proben von Platten mit einem alternativen Probenlayout (im Vergleich zu denen, die auf Verschleppung beurteilt wurden) generiert wurden; insgesamt 12 Injektionen, 126 kombinierte negative Proben; der Prozentsatz der falschen Ergebnisse aufgrund einer Kreuzkontamination beträgt 0,0 % (0/125) mit einem niedrigeren 95%-KI von 97,1 %. Von den 129 positiven Probenergebnissen waren alle klonal, mit Ausnahme von 2 unbestimmten Ergebnissen, die beide im Vergleich zu anderen positiven Proben hohe RFU-Peaks generierten und als gültige und potenziell kontaminierende Signale eingestuft wurden. Positive Probenergebnisse auf zwei Instrumenten ergaben einen durchschnittlichen RPR-Wert von 100,4 und der durchschnittliche RPR-Wert negativer Probenergebnisse auf zwei Instrumenten, die für die Verschleppungsbewertung und Kreuzkontamination qualifiziert waren, betrug 1,2 bzw. 1,2. (Tabelle 16)

Tabelle 16. Durchschnittliche RPR-Werte nach ABI-Instrument

Typ	ABI-Instrument	N (Nein)	Durchschnittliches RPR	%VK
Klonal	1	65	97,8	30,2
	2	62	103,2	36,3
	Kombiniert	127	100,4	33,5

Tabelle 16. Durchschnittliche RPR-Werte nach ABI-Instrument

Typ	ABI-Instrument	N (Nein)	Durchschnittliches RPR	%VK
Verschleppung (Nicht-klonal)	1	63	1,2	4,3
	2	62	1,2	5,0
	Kombiniert	125	1,2	4,6
Kreuzkontamination (Nicht-klonal)	1	53	1,2	4,3
	2	52	1,2	4,8
	Kombiniert	105	1,2	4,6

12.7. Analytische Spezifität: Laborinterne Präzisionsstudie

- 12.7.1. Die Präzision des IdentiClone Dx *IGH* Assay wurde ermittelt, indem dasselbe Probenpanel von 3 Bedienern über 20 Tage auf 3 Instrumenten mit 3 Reagenzienchargen getestet wurde. Das Probenpanel bestand aus 1 negativen gDNA-Probe, die aus einem Pool negativer klinischer Proben präpariert wurde, und 6 positiven Proben, die aus positiven klinischen Proben gDNA gemischt mit gepoolter negativer klinischer gDNA-Probe bei 1,5-facher LoD und 3X LoD präpariert wurden. Jede Probe im Panel wurde dreifach getestet und die Tests wurden im Abstand von mindestens 20 Tagen durchgeführt.
- 12.7.2. Alle Paneltestergebnisse stimmten mit dem erwarteten Klonalitätsergebnis überein (100,0 %). Die negative Probe ergab in allen (100,0 %) Replikaten nicht-klonale Ergebnisse. Die schwach positiven Proben (1,5-fach LoD) generierten klonale Ergebnisse bei allen (100,0 %) Replikaten und die stark positiven Proben generierten ebenfalls klonale Ergebnisse bei allen (100,0 %) Replikaten. Der %VK des RPR-Werts, der von jedem Mastermix erzeugt wird, ist in Tabelle 17, der von den schwach positiven Proben mit den klonalen Mastermixes erzeugt wird, ist unten dargestellt.
- 12.7.2.1. RPR-Wert für MMA, der beobachtete %VK betrug 12,2 %
- 12.7.2.2. RPR-Wert für MMB, der beobachtete %VK betrug 10,5 %
- 12.7.2.3. RPR-Wert für MMC, der beobachtete %VK betrug 8,5 %
- 12.7.3. Die Gesamtvariation zwischen Bediener, Instrumenten, Reagenzienchargen und Variation innerhalb eines Durchlaufs ist in Tabelle 17 dargestellt.
- 12.7.3.1. Die Ergebnisse des Chargenfaktors ergaben die größte Variabilität innerhalb eines Durchlaufs für alle Proben (durchschnittliche Variabilität = 7,9 %; Minimum = 0 % und Maximum = 42,3 %).
- 12.7.3.2. Die Ergebnisse des Bedienerfaktors generierten einen Durchschnitt von 3,1 % (Minimum = 0 % und Maximum = 21,7 %).
- 12.7.3.3. Die dem ABI-Instrument zugeschriebene prozentuale Varianz betrug durchschnittlich 2,2 % (Minimum = 0 % und Maximum = 8,5 %).
- 12.7.3.4. Die Ergebnisse des intrinsischen Faktors wurden einer durchschnittlichen Varianz von 86,9 % zugeschrieben (Minimum = 55,4 % und Maximum = 99,9 %).
- 12.7.4. Insgesamt stimmten alle Probenesterggebnisse mit dem erwarteten Klonalitätsergebnis überein (100,0 %). Der RPR-Wert %VK betrug ≤ 25 für schwach positive Proben mit MMA, MMB bzw. MMC über 3 Bediener, 3 Instrumente und 3 Reagenzienchargen.

Tabelle 17. Variabilität der Assaypräzision (innerhalb des Labors)

PM	MM	Valide N	Durchschn. RPR	Variationstyp				Gesamtvariation	
				Zwischen Bedienern	Zwischen Instrumenten	Zwischen Reagenzienchargen	Innerhalb eines Durchlaufs	SD	%VK
PM1	A	52	1,59	0,08 (7,7 %)	0,07 (5,9 %)	0,05 (3,3 %)	0,26 (83,2 %)	0,28	17,7
	B	53	1,67	0,00 (0,0 %)	0,05 (3,3 %)	0,06 (3,7 %)	0,28 (93,0 %)	0,29	17,2
	C	54	1,52	0,06 (7,1 %)	0,04 (3,4 %)	0,06 (5,2 %)	0,22 (84,3 %)	0,24	16,0
PM2	A	54	16,49	0,72 (12,8 %)	0,00 (0,0 %)	1,02 (25,7 %)	1,58 (61,5 %)	2,02	12,2
	B	54	22,09	0,00 (0,0 %)	0,05 (0,1 %)	0,00 (0,0 %)	2,16 (99,9 %)	2,16	9,8
	C	54	1,40	0,00 (0,0 %)	0,05 (8,5 %)	0,00 (0,0 %)	0,17 (91,5 %)	0,17	12,4
PM3	A	54	1,32	0,02 (1,3 %)	0,01 (0,5 %)	0,00 (0,0 %)	0,18 (98,2 %)	0,18	13,4
	B	53	23,57	0,20 (0,7 %)	0,60 (5,9 %)	1,53 (38,0 %)	1,84 (55,4 %)	2,47	10,5
	C	53	1,38	0,04 (5,6 %)	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,16 (94,4 %)	0,17	12,1

Tabelle 17. Variabilität der Assaypräzision (innerhalb des Labors)

PM	MM	Valide N	Durchschn. RPR	Variationstyp				Gesamtvariation	
				Zwischen Bedienern	Zwischen Instrumenten	Zwischen Reagenzienchargen	Innerhalb eines Durchlaufs	SD	%VK
PM4	A	53	25,94	0,56 (1,4 %)	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	4,72 (98,6 %)	4,76	18,3
	B	54	42,10	0,14 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	2,41 (13,8 %)	6,04 (86,2 %)	6,50	15,4
	C	52	37,59	0,00 (0,0 %)	0,41 (1,6 %)	0,00 (0,0 %)	3,17 (98,4 %)	3,20	8,5
PM5	A	54	33,44	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	2,05 (12,4 %)	5,46 (87,6 %)	5,83	17,4
	B	54	49,18	0,00 (0,0 %)	0,78 (2,3 %)	0,00 (0,0 %)	5,03 (97,7 %)	5,09	10,4
	C	54	1,39	0,00 (0,0 %)	0,03 (2,2 %)	0,00 (0,0 %)	0,18 (97,8 %)	0,18	13,1
PM6	A	52	1,34	0,01 (1,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,14 (99,0 %)	0,14	10,6
	B	54	10,82	0,27 (6,3 %)	0,00 (0,0 %)	0,40 (14,4 %)	0,95 (79,3 %)	1,06	9,8
	C	54	1,37	0,00 (0,0 %)	0,04 (5,1 %)	0,00 (0,0 %)	0,16 (94,9 %)	0,17	12,1
PM7	A	54	54,44	0,00 (0,0 %)	1,97 (3,6 %)	0,00 (0,0 %)	10,13 (96,4 %)	10,32	19,0
	B	54	93,12	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	10,30 (42,3 %)	12,02 (57,7 %)	15,83	17,0
	C	53	77,58	4,16 (21,7 %)	1,52 (2,9 %)	2,12 (5,7 %)	7,46 (69,7 %)	8,93	11,5

12.8. Messgenauigkeit: Multizentrische Reproduzierbarkeitsstudie

- 12.8.1. Der Zweck dieser Studie war es, festzustellen, ob der IdentiClone Dx *IGH* Assay bei Tests an 3 separaten Zentren wie vorgesehen funktioniert. Die Tests wurden an einem Panel durchgeführt, das 6 positive (3 niedrig-positive und 3 mittel-positive) und eine negative Probe mit dem Prüfprodukt in dreifacher Ausführung enthielt, wobei 2 Bediener an 3 verschiedenen Testzentren in 5 verschiedenen Testfällen eine Reagenziencharge verwendeten. Die negative Panelprobe wurde aus einem Pool klinischer Proben-gDNA präpariert, die zuvor als nicht-klonal für *IGH* bestimmt wurde, und die positiven Panelproben bestanden aus klinischer Proben-gDNA (zuvor als klonal für *IGH* bestimmt), die mit negativer gepoolter klinischer Proben-gDNA bei 1,5-facher LoD (niedrig-positiv) und 3X LoD (mittel-positiv) gemischt wurde.
- 12.8.2. Die negative Panelprobe ergab in allen gültigen Fällen (100,0 %, 88/88) an allen drei Zentren nicht-klonale Ergebnisse. Die niedrig- und mittel-positiven Panelproben generierten in allen gültigen Fällen (100,0 %, 90/90 bzw. 100,0 %, 90/90) klonale Ergebnisse an allen drei Zentren. Die Gesamtvariation der RPR-Werte je nach Zentrum, Bediener, Instanz, innerhalb eines Durchlaufs und dem RPR-Wert %VK für jede Panelprobe ist in Tabelle 18 dargestellt (dominanter Mastermix mit höchstem RPR nur für positive PMs, alle drei Mastermixe für negative PM).
- 12.8.3. Insgesamt lag die prozentuale Varianz, die dem Standort zugeschrieben wurde, im Durchschnitt bei 15,4 % und im Bereich von 0,0 % bis 50,9 %.
- 12.8.3.1. Die dem Bediener zugeschriebene prozentuale Varianz lag im Durchschnitt bei 0,5 % und im Bereich von 0,0 % bis 4,3 %.
- 12.8.3.2. Die der Testinstanz zugeschriebene prozentuale Varianz lag im Durchschnitt bei 9,9 % und im Bereich von 0,0 % bis 20,8 %.
- 12.8.3.3. Die % Varianz, die innerhalb eines Durchlaufs zugeschrieben wurde, lag im Durchschnitt bei 75,5 % bzw. 31,7 % bis 100,0 %.

Tabelle 18. Präzisionsvariabilität des IdentiClone Dx *IGH* Assay von Zentrum zu Zentrum nach RPR-Wert

Kontrollentyp	MM	N (Nein)	Übersichtsstatistik			Variationstyp				Gesamtvariation	
			Min.	Mittel	Max.	Zwischen Zentren	Zwischen Bedienern	Zwischen Fällen ¹	Innerhalb eines Durchlaufs	SD	%VK
Niedrig-positiv	A	88	7,00	22,91	29,70	0,00 (0,0 %)	0,04 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	3,44 (100 %)	3,44	15,0
	B	90	15,10	20,16	27,00	0,78 (10,0 %)	0,00 (0,0 %)	1,09 (19,6 %)	2,07 (70,4 %)	2,47	12,2
	C	90	31,10	54,81	72,10	2,40 (10,0 %)	0,43 (0,3 %)	3,07 (16,4 %)	6,50 (73,3 %)	7,59	13,8
Mittel-positiv	A	90	30,00	48,81	75,60	4,71 (35,1 %)	0,00 (0,0 %)	2,13 (7,2 %)	6,04 (57,7 %)	7,95	16,3
	B	90	26,00	38,83	59,10	2,77 (20,3 %)	0,00 (0,0 %)	2,80 (20,8 %)	4,72 (58,9 %)	6,15	15,8
	C	89	34,30	98,63	141,4	17,36 (50,9 %)	5,06 (4,3 %)	8,80 (13,1 %)	13,69 (31,7 %)	24,32	24,7

Tabelle 18. Präzisionsvariabilität des IdentiClone Dx *IGH* Assay von Zentrum zu Zentrum nach RPR-Wert

Kontroll- lentyp	MM	N (Nein)	Übersichtsstatistik			Variationstyp				Gesamtva- riation	
			Min.	Mittel	Max.	Zwischen Zentren	Zwischen Bedienern	Zwischen Fällen ¹	Innerhalb eines Durchlaufs	SD	%VK
Negativ	A	88	1,10	1,46	2,00	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,07 (12,3 %)	0,20 (87,7 %)	0,21	14,4
	B	90	1,10	1,43	2,30	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,21 (100 %)	0,21	15,0
	C	90	1,10	1,43	1,90	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,00 (0,0 %)	0,18 (100 %)	0,18	12,5

¹ Testdurchläufe; fünf pro Zentrum.

12.9. Validierung des Assay-Arbeitsablaufs: DNA-Extraktionsstudie

- 12.9.1. Diese Studie liefert objektive Nachweise, dass drei gängige, kommerziell erhältliche Extraktionsmethoden für genomische DNA (gDNA) eine ausreichende gDNA-Menge für den IdentiClone Dx *IGH* Assay erzeugen. Drei (3) verschiedene, im Handel erhältliche Extraktionsmethoden wurden bewertet: 1) Isolierung der Siliziumdioxidsäule, 2) automatisierte Extraktion auf Magnetkugelbasis (mit King Fisher Flex) und 3) Niederschlag wurden zur Extraktion von gDNA aus peripheren Blutproben verwendet, die in EDTA von 2 eindeutigen Spendern mit lymphoproliferativer B-Zell-Diagnose (klonal) und 8 eindeutigen gesunden Spendern (nicht-klonal) entnommen wurden. In Tabelle 19 sind die Kits nach Anbieter und Extraktionsmethode aufgeführt.

Tabelle 19: Extraktionskits nach Extraktionsmethode

Methode	Kitname	Anbieter	Extraktionsmethode
1	QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIA)	QIAGEN	Siliziumdioxidmembran
2	Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PWIZ)	Promega	Niederschlag
3	MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit (KFF)	Thermo Fisher Scientific	Magnetkugel

- 12.9.2. Die Proben wurden gemäß den Anweisungen des jeweiligen Herstellers extrahiert und die resultierende gDNA wurde mit einem UV-VIS-Spektralphotometer und NanoDrop 2000 quantifiziert. Nach der Quantifizierung wurde die gDNA (1 Replikat pro Extraktionsmethode) mit dem IdentiClone Dx *IGH* Assay getestet; die Datenanalyse erfolgte innerhalb von 48 Stunden nach der Extraktion.
- 12.9.3. Alle drei Extraktionsmethoden generierten nachweislich die für den Assay erforderliche Menge an gDNA, wobei jede Probe unabhängig von der Extraktionsmethode ≥ 250 ng gDNA erzeugte. Die Gesamt-gDNA-Menge wurde aus dem Durchschnitt aus 3 Replikaten von Nanodrop-Messwerten für jede der 10 Proben für jede Extraktionsmethode berechnet. (Tabelle 20) Zur Erfüllung der Anforderungen für jedes Extraktionskit wurden verschiedene Volumina verwendet:
- 12.9.3.1. Das PWIZ-Kit benötigte 300 μ l peripheres Blut und gDNA wurde in 100 μ l eluiert, was einen Bereich von 6846,7 ng bis 26.336,7 ng Gesamt-gDNA ergab.
- 12.9.3.2. Das QIA-Kit benötigte 200 μ l peripheres Blut und gDNA wurde in 50 μ l eluiert, was einen Bereich von 2656,7 ng bis 10.963,3 ng Gesamt-gDNA ergab.
- 12.9.3.3. Das KFF-Kit benötigte 300 μ l peripheres Blut und gDNA wurde in 50 μ l eluiert, was einen Bereich von 6795,0 ng bis 33.338,3 ng Gesamt-gDNA ergab.

Tabelle 20: Zusammenfassung der Gesamt-gDNA-Extraktion

Probenr.	QIA Gesamt- gDNA (ng)	QIA durchschnitt- liche gDNA- Konzentration (ng/ μ l)	PWIZ Gesamt- gDNA (ng)	PWIZ- Durchschnitt gDNA Konzentration (ng/ μ l)	KFF Gesamt- gDNA (ng)	KFF durchschnitt- liche gDNA Konzentration (ng/ μ l)
1	7230,0	144,6	19.163,3	191,6	22.101,7	442,0
2	3651,7	73,0	7593,3	75,9	10.471,7	209,4
3	2656,7	53,1	6846,7	68,5	8313,3	166,3
4	4238,3	84,8	9586,7	95,9	9535,0	190,7
5	4908,3	98,2	13.496,7	135,0	14.426,7	288,5

Tabelle 20: Zusammenfassung der Gesamt-gDNA-Extraktion

Probenr.	QIA Gesamt-gDNA (ng)	QIA durchschnittliche gDNA-Konzentration (ng/μl)	PWIZ Gesamt-gDNA (ng)	PWIZ-Durchschnitt gDNA Konzentration (ng/μl)	KFF Gesamt-gDNA (ng)	KFF durchschnittliche gDNA Konzentration (ng/μl)
6	5496,7	109,9	13.506,7	135,1	16.171,7	323,4
7	3981,7	79,6	11.896,7	119,0	14.963,3	299,3
8	4403,3	88,1	11.990,0	119,9	6975,0	139,5
9	8776,7	175,5	17.043,3	170,4	20.606,7	412,1
10	10.963,3	219,3	26.336,7	263,4	33.338,3	666,8

- 12.9.4. Alle 30 Replikate (10 mit 3 Extraktionsmethoden getestete Proben) generierten mindestens 250 ng gDNA (30/30, mit einem unteren Grenzwert des 95%-Konfidenzintervalls ≥ 80 %). Die aus den PWIZ- und KFF-Methoden gewonnene Gesamt-gDNA war ähnlich, da das gleiche periphere Bluteingangsvolumen (300 μl) pro Extraktion verwendet wurde, im Vergleich zur QIA, das ein niedrigeres peripheres Bluteingangsvolumen (200 μl) verwendete. Beim Testen mit dem IdentiClone Dx *IGH* Assay zeigte die extrahierte gDNA ähnliche RPR-Werte (%VK im Bereich von 1–21 %) und konkordante Mastermix-Ergebnisse bei allen drei Extraktionsmethoden. (Tabelle 21) Die Probenverarbeitung (einschließlich DNA-Extraktion) bis zum Ergebnis (einschließlich Datenanalyse) dauerte für alle Proben höchstens 28 Stunden.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse des IdentiClone Dx *IGH* Assay mit den 3 Extraktionsmethoden

Probe	MM oder Gesamt	QIA RPR	PWIZ RPR	KFF RPR	%VK
PM1	A	1,5	1,5	1,3	7 %
	B	1,6	1,8	1,2	16 %
	C	1,4	1,3	1,4	3 %
	Gesamt	Nicht-klonal	Nicht-klonal	Nicht-klonal	k. A.
PM2	A	SQ-Fehler*	1,4	1,3	4 %
	B	1,3	1,3	1,5	7 %
	C	1,8	1,1	1,4	20 %
	Gesamt	k. A.	Nicht-klonal	Nicht-klonal	k. A.
PM3	A	1,3	1,6	1,5	9 %
	B	1,5	1,1	1,6	15 %
	C	1,8	1,2	1,2	20 %
	Gesamt	Nicht-klonal	Nicht-klonal	Nicht-klonal	k. A.
PM4	A	Ungültig	1,2	1,4	8 %
	B	1,8	1,4	1,4	12 %
	C	1,2	1,4	1,3	6 %
	Gesamt	k. A.	Nicht-klonal	Nicht-klonal	k. A.
PM5	A	1,5	1,4	1,2	9 %
	B	1,4	1,1	1,5	13 %
	C	1,2	1,2	1,1	4 %
	Gesamt	Nicht-klonal	Nicht-klonal	Nicht-klonal	k. A.
PM6	A	1,6	1,2	1,2	14 %
	B	1,2	1,5	Ungültig	11 %
	C	1,4	1,6	1,6	6 %
	Gesamt	Nicht-klonal	Nicht-klonal	k. A.	k. A.
PM7	A	1,2	1,3	1,6	12 %
	B	1,5	1,7	1,3	11 %
	C	1,7	1,4	1,2	14 %
	Gesamt	Nicht-klonal	Nicht-klonal	Nicht-klonal	k. A.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse des IdentiClone Dx *IGH* Assay mit den 3 Extraktionsmethoden

Probe	MM oder Gesamt	QIA RPR	PWIZ RPR	KFF RPR	%VK
PM8	A	1,3	1,2	Ungültig	4 %
	B	1,5	1,7	1,5	6 %
	C	1,3	1,3	1,6	10 %
	Gesamt	Nicht-klonal	Nicht-klonal	k. A.	k. A.
PM9	A	1,7	1,3	1,6	11 %
	B	66,3	112,8	86,9	21 %
	C	76,5	65,9	71,5	6 %
	Gesamt	Klonal	Klonal	Klonal	k. A.
PM10	A	145,9	185,7	165,9	10 %
	B	196,7	192,6	196,9	1 %
	C	233,2	199,1	216,5	6 %
	Gesamt	Klonal	Klonal	Klonal	k. A.

*Wurde nicht erneut getestet.

N. zutr. = Nicht zutreffend

12.10. Validierung des Assay-Arbeitsablaufs: DNA-Eingabestudie

- 12.10.1. Zweck dieser Studie ist es, objektive Nachweise für die gDNA-Eingabeanforderungen für den IdentiClone Dx *IGH* Assay zu liefern. Die Bewertung von 5 verschiedenen gDNA-Eingabemengen (500 ng, 250 ng, 200 ng, 125 ng und 25 ng) wurde mit dem IdentiClone Dx *IGH* Assay an 10 klinischen Proben (5 mit positiver klinischer Diagnose und 5 mit negativer klinischer Diagnose einer B-Zell-Lymphoproliferation) durchgeführt. Die Konzentration aller gDNA-Proben wurde mit demselben Nanodrop 2000 Spektralphotometer gemessen. Die Tests wurden in doppelter Ausführung über 6 Durchläufe auf 1 ABI 3500xL Dx Instrument von 1 Bediener mit 1 Reagenziencharge über mehrere Tage durchgeführt.
- 12.10.2. Von den 100 möglichen Klonalitätsstatusergebnissen (10 Proben wurden doppelt für 5 verschiedene Eingabebedingungen getestet) ergaben 96 Gesamtergebnisse (unter Verwendung aller 3 Mastermixe). Die 4 Proben, die keine Gesamtergebnisse generierten, enthielten den niedrigsten DNA-Eingabespiegel (25 ng), bei dem Replikate aufgrund einer niedrigen Amplifikation in einem oder mehreren Mastermixen ungültige Ergebnisse aufwiesen. Die wahrscheinliche Ursache dieser ungültigen Ergebnisse ist ein unzureichende DNA-Eingabe, daher wurden diese ungültigen Ergebnisse nicht erneut getestet. Von den insgesamt 96 erzielten Ergebnissen stimmten 95 mit den erwarteten Ergebnissen überein; die Gesamtübereinstimmung beträgt 99,0 %; Tabelle 22 zeigt die Übereinstimmung der Ergebnisse des Klonalitätsstatus pro Panelprobe und DNA-Eingabekonzentration. Das 1 diskordante Ergebnis trat in PM09 auf, das den niedrigsten DNA-Input-Spiegel (25 ng) enthielt; ein Replikat dieser erwarteten nicht-transparenten Panelprobe ergab mit Mastermix B das Ergebnis Clonal (Klonal), was einen RPR-Wert von 3,2 erzeugte, der über dem Assay-Grenzwert von 3,0 liegt. Dieses diskordante Ergebnis war möglicherweise auf die niedrige DNA-Eingabe zurückzuführen, die möglicherweise die Hintergrundpeak-RFU (den Nenner für die RPR-Berechnung) um mehr als die RFU des höchsten Peaks (den Zähler für die RPR-Berechnung) reduziert hat, wodurch das RPR künstlich in die Höhe getrieben wurde, sodass es leicht über dem Grenzwert-RPR von 3,0 lag. Von den 20 Klonalitätsstatusergebnissen, die mit der vorgesehenen DNA-Eingabe (250 ng) generiert wurden, stimmten alle mit den erwarteten Ergebnissen überein. Die Gesamtergebniskonkordanz für die vorgesehene DNA-Eingabekonzentration beträgt 100,0 %.

Tabelle 22: Gesamtergebnis-Konkordanz

Panelprobe	Erwartete Klonalität	Gesamtergebnis-Konkordanz				
		500 ng	250 ng (Vorgesehen)	200 ng	125 ng	25 ng
PM01	Clonal (Klonal)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM02	Clonal (Klonal)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM03	Clonal (Klonal)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM04	Clonal (Klonal)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM05	Clonal (Klonal)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM06	Non-Clonal (Nicht-klonal)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	k. A.

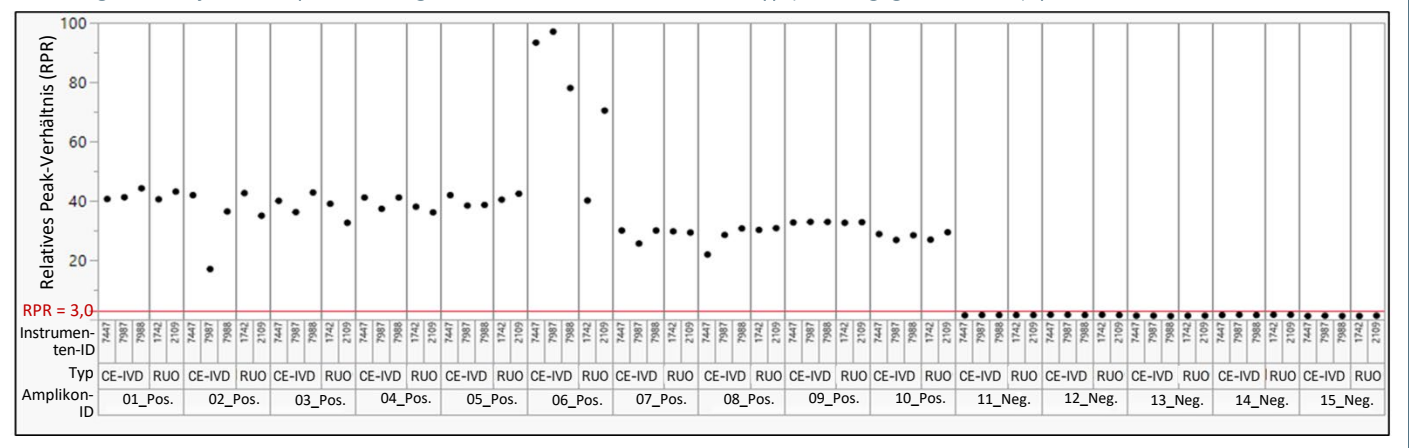
Tabelle 22: Gesamtergebnis-Konkordanz

Panelprobe	Erwartete Klonalität	Gesamtergebnis-Konkordanz				
		500 ng	250 ng (Vorgesehen)	200 ng	125 ng	25 ng
PM07	Non-Clonal (Nicht-klonal)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	k. A.
PM08	Non-Clonal (Nicht-klonal)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
PM09	Non-Clonal (Nicht-klonal)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	50 % (1/2)
PM10	Non-Clonal (Nicht-klonal)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)	100 % (2/2)
Gesamt		100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	93,8 % (15/16)

12.11. Validierung des Assay-Arbeitsablaufs: Äquivalenz: 3500xL gegenüber 3500xL Dx

- 12.11.1. Diese Studie zeigt, dass die Ergebnisse des IdentiClone Dx *IGH* Assay bei Verwendung von zwei verschiedenen Versionen eines ähnlichen Instruments gleichwertig sind:
- 12.11.1.1. Der Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer (RUO) und
- 12.11.1.2. der Applied Biosystems 3500xL Dx Genetic Analyzer (CE-IVD)
- 12.11.2. Proben, die aus 15 Amplikonen aus 10 klonalen und 5 nicht-klonalen Proben bestanden (zusätzlich zu den Amplikonen der zugehörigen Durchlaufkontrollen), wurden mit dem IdentiClone Dx *IGH* Assay auf jeweils 5 verschiedenen ABI 3500 Instrumenten (2 RUO und 3 CE-IVD) getestet.
- 12.11.3. Insgesamt wurden 75 gültige Ergebnisse von den 5 verschiedenen Instrumenten (15 Amplikons x 1 Replik x 5 Instrumente) generiert. Diese Ergebnisse wurden weiter evaluiert, um das relative Peak-Verhältnis (RPR), die Ergebnisse des Klonalitätsstatus, das durchschnittliche RPR nach Instrumententyp und die durchschnittliche RPR-Differenz zwischen Instrumententypen zu berechnen. (Abbildung 12)
- 12.11.4. Die mit den 15 Amplikons (10 klonal/positiv und 5 nicht-klonal/negativ) erzielten Testergebnisse entsprachen 100 % den erwarteten Ergebnissen auf allen 5 Instrumenten. Die von den positiven Amplikons generierten RPR-Werte lagen im Bereich von 17,0–97,0 und die von den negativen Amplikons generierten RPR-Werte im Bereich von 1,2–1,6. Eine Differenz von maximal 61,9 % wurde aus den durchschnittlichen RPR-Werten berechnet, die von den verschiedenen Instrumenten erzeugt wurden. Dies kann jedoch auf einen „Ausreißer“ des RUO-Testergebnisses zurückgeführt werden, das im Vergleich zu den Ergebnissen der anderen vier Instrumente einen signifikant niedrigeren RPR-Wert ergab (40,1 im Vergleich zu 70,4, 78,0, 93,3, 97,0 bzw. 78,0). Da es sich bei diesem Amplikon um ein hoch positives Amplikon handelt (hohe Klonalität in %), ist es unwahrscheinlich, dass es beim Testen auf einem Instrumententyp einen Unterschied im klonalen Statusergebnis verursacht. Die höchste beobachtete prozentuale Differenz für die verbleibenden positiven und negativen Amplikons betrug 18,1 % bzw. 4,2 %. Insgesamt zeigen die 100,0 % konkordanten Ergebnisse der 5 verschiedenen Instrumente, dass die Leistung des IdentiClone Dx *IGH* Assay auf den Genanalysatoren ABI 3500xL Dx und ABI 3500xL gleichwertig ist.

Abbildung 12: Von jedem Amplikon erzeugte RPR-Werte, nach Instrumententyp (CE-IVD gegenüber RUO), pro Instrumenten-ID



12.12. Klinische Validierung

- 12.12.1. Überblick über die klinische Pivot-Genauigkeitsstudie
- 12.12.1.1. Diese Pivot-Genauigkeitsstudie wurde konzipiert, um die Gleichwertigkeit der klinischen Leistung zwischen dem IdentiClone Dx *IGH* Assay (dem Prüfprodukt) und einem Vergleichsprodukt bei retrospektiver und restlicher anonymisierter DNA zu bewerten, die aus Proben aus peripherem Blut (PB) von Personen mit Verdacht auf B-Zell-Lymphoproliferationen extrahiert wurde. Das Vergleichsprodukt ist ein im Handel erhältlicher IVD-Assay (zum Zeitpunkt der Studie), der NGS zum Nachweis von klonalen *IGH*-Genumlagerungen (Referenzassay) anwendet, wobei der Verwendungszweck dem Prüfprodukt, dem IdentiClone Dx *IGH* Assay, bei demselben Probenotyp ähnelt.
- 12.12.1.2. Der IdentiClone Dx *IGH* Assay wurde von Invivoscribe als *In-vitro*-Diagnostikum entwickelt, das für den qualitativen kapillaren Elektrophorese-basierten Nachweis von klonalen Immunglobulin-Starkketten(*IGH*)-Genumanordnungen in genomischer DNA, die aus peripherem Blut von Patienten mit vermuteter Lymphoproliferation extrahiert wurde, bestimmt ist. Der Referenzassay verwendet die NGS-Technologie, um klonale *IGH* V_H-J_H-Reanordnungen, die zugehörigen DNA-Sequenzen der V_H-J_H-Region und die Häufigkeitsverteilung der Nutzung von V_H- und J_H-Regionssegmenten zu identifizieren.
- 12.12.2. Studienziele
- 12.12.2.1. Die Ziele dieser Pivotal-Genauigkeitsstudie waren 1) der Nachweis der Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des IdentiClone Dx *IGH* Assay und des Referenzassays durch Bewertung der positiven und negativen prozentualen Übereinstimmung zwischen den beiden Assays und 2) die Einschätzung der Beziehung zwischen Krankheitsdiagnosen und dem Nachweis der Klonalität.
- 12.12.3. Patientenpopulation
- 12.12.3.1. Insgesamt wurden 303 Proben in die Studie aufgenommen; 54 Proben waren jedoch nicht für einen Vergleich zwischen dem Referenzassay und dem Prüfprodukt (IdentiClone Dx *IGH* Assay) geeignet. Von diesen wurden 4 Proben nicht an das Testzentrum geschickt und 50 Proben waren entweder nicht ausreichend (Quantity Not Sufficient, QNS) oder hatten Ergebnisse, die mit mindestens einem Assay nicht bewertet werden konnten, sodass sie für die Aufnahme in die Vergleichsanalyse ungeeignet waren. Die übrigen 249 Proben bestanden aus zwei Analysepopulationen, 1) einem Analyseset *mit* gesunden Probanden (n=249), das DNA aus peripherem Blut von Probanden mit Verdacht auf lymphoproliferative Erkrankung mit negativen B-Zell-Klonalitätsergebnissen oder aus normalen, gesunden peripheren Blutproben extrahierte DNA enthielt, und 2) einem Analyseset *ohne* gesunde Probanden (n=203), das DNA-Proben von Patienten mit Diagnose einer lymphoproliferativen B-Zell-Erkrankung enthielt.
- 12.12.3.1.1. Alle in die Studie aufgenommenen Studienteilnehmer (Proben) wurden in das Aufnahmeset (ES) aufgenommen. Die Übereinstimmungsanalyse zwischen dem IdentiClone Dx *IGH* Assay und dem Referenzassay verwendete die ES-Population.
- 12.12.3.1.2. Der primäre Analysesatz (Primary Analysis Set, PAS) umfasst Proben aus der Population mit positiven, negativen oder ungültigen/nicht bestimmbareren Ergebnissen aus den Ergebnissen des IdentiClone Dx *IGH* Assay und positiven oder negativen Ergebnissen aus der Referenzmethode.
- 12.12.4. Auswahl von Patienten und Aliquots für den IdentiClone Dx *IGH* Assay
- 12.12.4.1. Das Studiendesign verwendete anonymisierte restliche DNA-Proben aus klinischen Tests und war daher von der Notwendigkeit der Einwilligung einzelner Studienteilnehmer ausgenommen.
- 12.12.4.2. Es wurde nur eine Probe pro Studienteilnehmer in den abschließenden Analysesatz aufgenommen, der zur Beurteilung der primären Ziele verwendet wurde.
- 12.12.5. Sicherheitsanalyse
- 12.12.5.1. Es wird nicht erwartet, dass der IdentiClone Dx *IGH* Assay ein direktes Risiko für die Sicherheit der Probanden darstellt, und es wurden keine Behandlungsentscheidungen basierend auf den Ergebnissen des IdentiClone Dx *IGH* Assay getroffen.
- 12.12.6. Wirksamkeit
- 12.12.6.1. Primäre klinische Validierung des IdentiClone Dx *IGH* Assay
- 12.12.6.1.1. Die primäre Absicht dieser klinischen Studie begründet die Übereinstimmung zwischen dem Prüfprodukt (IdentiClone Dx *IGH* Assay) und einem Referenzassay (einem handelsüblichen IVD-Assay [zum Zeitpunkt der Studie], der NGS zum Nachweis von klonalen *IGH*-Genumlagerungen anwendet, wobei der Verwendungszweck dem Prüfprodukt ähnelt).
- 12.12.6.1.2. Die Übereinstimmung zwischen dem Prüfprodukt (IdentiClone Dx *IGH* Assay) und den Klonalitätsergebnissen des Referenzassays ist in Tabelle 23. Von den 249 mit der Referenzmethode auswertbaren evaluierbaren Proben berichteten 243 dasselbe Ergebnis mit beiden Methoden.

Tabelle 23: Übereinstimmung zwischen dem IdentiClone Dx IGH Assay (IUO) und dem Referenzassay (IVD), einschließlich gesunder Probanden

IdentiClone Dx IGH Assay (IUO)	Referenztest (IVD)		
	+	-	Gesamt
+	129	1	130
-	5	114	119
Gesamt	134	115	249

- 12.12.6.1.3. In Tabelle 24 ist die Übereinstimmung basierend auf der Übereinstimmung zwischen den Klonalitätsergebnissen des IdentiClone Dx IGH Assay (IUO) und des NGS-basierten Referenzassays (IVD) aufgeführt. Von den 249 getesteten auswertbaren Proben stimmten 114 der 115 negativen (-) Proben zwischen beiden Methoden überein, 129 von 134 der positiven (+) Proben stimmten überein, wobei die NPA 99,1 % und die PPA 96,3 % betrug. Der untere Grenzwert des 95%-Konfidenzintervalls (KI) für die NPA beträgt 95,3 %, während der untere Grenzwert des 95%-KI für die PPA 91,5 % beträgt; in Tabelle 24 ist die Übereinstimmung zwischen dem Prüfprodukt und der Referenzmethode beschrieben. Die positiven und negativen Wahrscheinlichkeitsquotienten sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 24: Übereinstimmung zwischen dem Prüfprodukt und dem Referenzassay

Maß der Übereinstimmung	Prozentuale Übereinstimmung (n/N)	95%-KI ¹
NPA	99,1 % (114/115)	(95,3 %, 100,0 %)
PPA	96,3 % (129/134)	(91,5 %, 98,8 %)

¹ Das 95%-KI wird mittels der exakten Methode (nach Clopper-Pearson) berechnet.

Tabelle 25: Wahrscheinlichkeitsquotient zwischen dem IdentiClone Dx IGH Assay und dem Referenzassay (IVD), einschließlich gesunder Probanden

Positiver Wahrscheinlichkeitsquotient	Negativer Wahrscheinlichkeitsquotient
110,709	0,038

- 12.12.6.1.4. Tabelle 26 zeigt die Übereinstimmung zwischen den Klonalitätsergebnissen des Prüfprodukts und des Referenzassays *ohne* gesunde Probanden. Von den 203 evaluierbaren Proben, die mit der Referenzmethode auswertbar waren, berichteten 197 dasselbe Ergebnis mit beiden Methoden.

Tabelle 26: Übereinstimmung zwischen dem IdentiClone Dx IGH Assay (IUO) und dem Referenzassay (IVD), ausgenommen gesunde Probanden

IdentiClone Dx IGH Assay (IUO)	NGS-basierter Referenzassay (IVD)		
	+	-	Gesamt
+	128	1	129
-	5	69	74
Gesamt	133	70	203

- 12.12.6.1.1. Die Konkordanz basiert auf der Übereinstimmung zwischen dem Prüfprodukt und dem Referenzassay unter *Ausschluss* gesunder Probanden (Tabelle 27). Von den 203 getesteten auswertbaren Proben stimmten 69 der 70 negativen (-) Proben zwischen beiden Methoden überein, 128 von 134 der positiven (+) Proben stimmten überein, bei einer NPA von 98,6 % und einer PPA von 96,2 %. Der untere Grenzwert des 95%-KI für die NPA beträgt 92,3 %, während der untere Grenzwert des 95%-KI für die PPA 91,4 % beträgt. Die positiven und negativen Wahrscheinlichkeitsquotienten sind in Tabelle 28.

Tabelle 27: Übereinstimmung zwischen dem IdentiClone Dx IGH Assay (IUO) und dem Referenzassay (IVD), ausgenommen gesunde Probanden

Maß der Übereinstimmung	Prozentuale Übereinstimmung (n/N)	95%-KI ¹
NPA	98,6 % (69/70)	(92,3 %, 100,0 %)
PPA	96,2 % (128/133)	(91,4 %, 98,8 %)

¹ Das 95%-KI wird mittels der exakten Methode (nach Clopper-Pearson) berechnet.


Tabelle 28: Wahrscheinlichkeitsquotient zwischen dem IdentiClone Dx *IGH* Assay und dem Referenzassay (IVD), ausgenommen gesunde Probanden

Positiver Wahrscheinlichkeitsquotient	Negativer Wahrscheinlichkeitsquotient
67,368	0,038

12.12.7. Schlussfolgerungen

- 12.12.7.1. Diese klinische Bewertung des IdentiClone Dx *IGH* Assay bestätigt, dass das Prüfprodukt klonale Ereignisse im Immunglobulin-Schwerkettengen (*IGH*-Gen) genau nachweist.
- 12.12.7.2. Diese Pivot-Genauigkeitsstudie liefert einen dokumentierten Nachweis dafür, dass das Prüfprodukt und die Referenzmethode (Vergleichsprodukt) ähnliche Nachweisraten für klonale *IGH*-Ereignisse aufweisen. Die primären Übereinstimmungsziele wurden auf 70 % eines unteren Grenzwerts eines 95-%-KI sowohl für NPA als auch für PPA festgelegt, da diese beiden Technologien recht unterschiedlich sind. Die Studienergebnisse belegen jedoch, dass diese beiden Technologien klonale Ereignisse mit einer sehr ähnlichen Rate identifizieren.
- 12.12.7.3. Mit beiden Methoden wurde restliche anonymisierte DNA, die aus Proben aus peripherem Blut (PB) von Personen mit Verdacht auf lymphoproliferative B-Zell-Erkrankungen extrahiert wurde, getestet. Eine Untergruppe von 249 Proben erzielte auswertbare Ergebnisse mit beiden Assays und das Akzeptanzkriterium der Studie wurde erfüllt:
 - 12.12.7.3.1. Der untere Grenzwert des exakten 95-%-KI der NPA musste größer oder gleich 70 % sein. Der untere Grenzwert betrug 95 %.
 - 12.12.7.3.1.1. Die diagnostische Spezifität wurde mit 0,991 berechnet.
 - 12.12.7.3.1.2. Negativer Wahrscheinlichkeitsquotient: 0,038
 - 12.12.7.3.2. Der untere Grenzwert des exakten PPA-95-%-KI war größer oder gleich 70 %. Der untere Grenzwert betrug 92 %.
 - 12.12.7.3.2.1. Diagnostische Sensitivität, berechnet auf 0,963.
 - 12.12.7.3.2.2. Positiver Wahrscheinlichkeitsquotient 110,709
- 12.12.7.4. Bei der Prüfmethode gab es ein falsch-positives und fünf falsch-negatives Ergebnis.
- 12.12.7.5. Diese klinische Bewertung des IdentiClone Dx *IGH* Assay bestätigt, dass das Prüfprodukt klonale Ereignisse im *IGH*-Gen genau nachweist.
- 12.12.7.6. Während der Durchführung dieser Studie wurden keine Sicherheitsbedenken festgestellt.

13. Referenzen

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. "Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2024; 74:229–263.
2. Siegel RL, Miller KD, and Jemal A. "Cancer Statistics, 2020." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2020; 70:7-30.
3. Cowan AJ, Allen C, Barac A, et al. "Global Burden of Multiple Myeloma: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016." *Journal of American Medicine*, 2018 Sep; 4(9):1221-1227.
4. Miller JE, et al. "An automated semiquantitative B- and T-cell clonality assay." *Molecular Diagnostics*, 1999; 4(2):101-117.
5. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, 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." *Leukemia*, 2004 Jan; 17(12):2257–2317.
6. Van Krieken JHJM, Langerak AW, Macintyre EA, et al. "Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936." *Leukemia*, 2007 Feb; 21(2):201-206.
7. Evans PAS, Pott Ch, Groenen PJTA, et al. "Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936." *Leukemia*, 2007 Mar; 21(2):207-214.
8. Hongxiang L, Bench AJ, Bacon CM, et al. "A practical strategy for the routine use of BIOMED-2 PCR assays for detection of B- and T-cell clonality in diagnostic haematopathology." *British Journal of Haematology*, 2007 Jul; 138(1):31-43.
9. Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggemann M, et al. (2012) "EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations." *Leukemia*, 2012 Aug; 26(10):2159-2171.
10. Berget E, Helgeland L, Molven A, and Ventermyr, OK. "Detection of clonality in follicular lymphoma using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples and BIOMED-2 immunoglobulin primers." *Journal of Clinical Pathology*, 2011; 64:37-41.
11. Hongxin F and Robetorye RS. "Detection of clonal immunoglobulin heavy chain gene rearrangements by the polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis." *Methods in Molecular Biology*, 2013; 999:151-167.
12. Kokovic I, Novakovic BJ, Cerkovnik P, and Navakovic S. "Clonality analysis of lymphoid proliferations using the BIOMED-2 clonality assays: a single institution experience." *Radiology and Oncology*, 2014 Jun; 48(2):155-162.
13. Roepman P, Boots C-M, Scheidel KC, et al. "Molecular clonality assessment shows high performance to predict malignant B-cell non-Hodgkin's lymphoma using cytological smears." *Journal of Clinical Pathology*, Published Online First: [12 May 2016] doi:10.1136/jclinpath-2016-203757
14. Zhang J-J, Xie Y-X, Luo L-L, et al. "A comparison of capillary electrophoresis and next-generation sequencing in the detection of immunoglobulin heavy chain H and light chain κ gene rearrangements in the diagnosis of classic hodgkin's lymphoma." *Bioengineered*, 2022; 13:3, 5868-5879.
15. Kirkham PM, Martari F, Newton JA and Schroeder HW. "Immunoglobulin VH clan and family identity predicts variable domain structure and may influence antigen binding." *The EMBO Journal*, 1992; 11(2):603-609.
 - IdentiClone Dx IGH Software Instructions for Use – English (Invivoscribe : 310000)
 - ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer User Manual (Thermo Fisher: 100079380 Revision D)
 - ABI 3500xL Genetic Analyzer User Manual (Thermo Fisher: 4401661 Revision C)

14. Technischer Support und Kundendienst

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

Invivoscribe, Inc

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










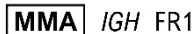

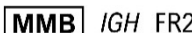

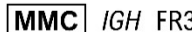







Website: www.invivoscribe.com | Geschäftszeiten: 7:00 Uhr bis 17:00 Uhr PST/PDT

Telefon: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601

Technischer Kundendienst: support@invivoscribe.com | Kundendienst: sales@invivoscribe.com

15. Symbole

Die folgenden Symbole werden für die Beschriftung dieses Produkts verwendet:

	Katalognummer		Taq-DNA-Polymerase
	Reagenzvolumen		IGH-Positivkontrolle
	Chargennummer		Negativkontrolle
	Lagerbedingungen		Nicht-Template-Kontrolle (NTC)
	Individuelle Geräteerkennung		MMA IGH FR1 (Mastermix A)
	Verfallsdatum		MMB IGH FR2 (Mastermix B)
	Vor Licht schützen		MMC IGH FR3 (Mastermix C)
	Hersteller		Gebrauchsanweisung beachten
	Europäische Konformität		Bevollmächtigter Schweizer Vertreter
	In-vitro-Diagnostikum		Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft
			Verantwortliche Person im Vereinigten Königreich

16. Haftungshinweis

Rechtliche Hinweise zu diesem Produkt finden Sie unter: <https://invivoscribe.com/legal-notice/>

17. Versionsverlauf

Tabelle 29: Revisionsverlauf des IdentiClone Dx IGH Assay und Validierung durch benannte Stelle

Revision der Gebrauchsanweisung	Ausgabedatum	Beschreibung der Änderung	Von der Benannten Stelle validierte Revision
H	Dezember 2025	Erste Freigabe zur Einreichung bei der Benannten Stelle.	<input checked="" type="checkbox"/> Ja Validierungssprache: Englisch <input type="checkbox"/> Nein