

Mentype[®] DIPquant

Návod k použití

**Aplikace qPCR pro alelově specifickou
kvantifikaci stavu chimérismu**

Diagnostika in vitro



DIQIFU01v2cz

Červen 2021



45-015xx*-0025

45-01591-0100



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
D-01109 DRESDEN
GERMANY

xx * - definuje číslo položky specifické pro lokus

Vyrobeno v Německu

Biotype GmbH vyvíjí, vyrábí a distribuuje aplikace založené na PCR pro lékařskou diagnostiku.

Naše testovací sady Mentype® zaručují nejvyšší standardy kvality.

Pro informace a návrhy jsme vám rádi k dispozici. Kontaktujte nás nebo navštivte naši domovskou stránku www.biotype.de.

Obsah

1. Použití v souladu s určením	5
2. Podkladové informace.....	5
3. Popis produktu Mentype® DIPquant	5
3.1 Nástroj qPCR.....	6
3.2 Typ vzorků	6
3.3 Senzitivita/specifičnost.....	6
3.3.1 Rozsah měření chimérismu	6
3.3.2 Citlivost a specifičnost	6
4. Výstrahy a bezpečnostní upozornění.....	8
4.1 Zajištění kvality.....	8
5. Materiály dodané společně se sadou	9
5.1 Obsah sady.....	9
5.2 Informace pro objednání	9
5.3 Požadované reagentie a vybavení nejsou součástí kitu	9
6. Skladování	10
7. Pracovní postup.....	11
7.1 Přehled analýzy chimérismu produkty Mentype®DIP	11
7.2 Příprava vzorků a množství použité DNA.....	11
7.2.1 Izolace DNA	11
7.2.2 Templátová DNA	12
7.3 Příprava master mixu	12
7.3.1 Pozitivní kontrola	13
7.3.2 Negativní kontrola	13
7.4 Reakční objem	14
8. Program qPCR a amplifikace	14
8.1 Nastavení přístroje a parametry amplifikace	14
8.2 Parametry detekce.....	14
8.3 Parametry amplifikace qPCR*	14
9. Doporučené nastavení analýzy	15
9.1 Kvantifikace před transplantací (pre-HSCT)	15
9.2 Kvantifikace po transplantaci / sledování (po HSCT)	16
10. Vyhodnocení	17
10.1 Analýza dat	17
10.2 Kontrola výsledků	17
11. Kvantifikace	18
11.1 Kvantifikace vzorků před HSCT	18
11.2 Kvantifikace vzorků po HSCT	18
12. Interpretace neobvyklých výsledků.....	19
12.1 Nízká síla signálu nebo bez detekovaného signálu.....	19

12.2 Kolísání síly signálu v replikátech	19
12.3 Signály testů specifických pro recipienta v DNA dárce	20
13. Objednací informace	21
14. Reference	23
15. Ochranné známky a vyloučení odpovědnosti	24
16. Symboly	25
A Analytické údaje o výkonu (ověření)	26
A a) Lidská DNA	26
A b) Analytická specifčnost a Limit slepého pokusu (LoB)	26
A c) Analytická citlivost a mez detekce (LoD)	26
A d) Měřicí rozsah testů	27
A e) Variace mezi šaržemi a testování parametrů testu v LoD	27
A f) Měření ve dvou různých dnech	28
A g) Stabilita po otevření	28
B Údaje o klinickém výkonu	29
B a) Etické a regulační aspekty	29
B b) Preanalytika, izolace DNA a kvantifikace DNA	29
B c) Konkordanční analýza	29
B d) Výsledky a diskuse	30
B e) Reference	32

Mentype[®] DIPquant

1. Použití v souladu s určením

Aplikace Mentype[®] **DIPquant** jsou založeny na in vitro diagnostice založené na PCR (qPCR) v reálném čase pro alelicky specifickou a kvantitativní analýzu molekulárního chimerismu po alogenní transplantaci kostní dřeně a krevních kmenových buněk pomocí delece / inserce polymorfismů (DIP, také označované jako INDELS, viz 14 Reference).

Aplikace Mentype[®] **DIPquant** jsou určeny výhradně pro profesionální použití ve specializovaných laboratořích. Personál by měl být vyškolen v technikách qPCR a používání diagnostických zdravotnických prostředků in vitro.

2. Podkladové informace

Analýza molekulárního chimerismu po alogenní transplantaci kostní dřeně a krevních kmenových buněk je zásadní pro sledování růstu transplantátu nebo pro včasné odhalení hrozící odmítavé reakce. Molekulární chimérická analýza se provádí pomocí detekce individuálně specifických polymorfismů delecí / insercí DNA, které jsou velmi vhodné pro analýzu pomocí alelově specifických qPCR, ve srovnání s jinými sekvencemi DNA.

V návaznosti na identifikaci informativních lokusů DIP pacienta a dárce pomocí CE-MD kitu Mentype[®] **DIPscreen**, lze s odpovídajícími testy Singleplex Mentype[®] **DIPquant** provést kvantitativní analýzu chimérismu. Flexibilní formát testu umožňuje analýzu jednotlivých vzorků i velkých objemů vzorků s minimálními náklady na materiál. Protože je vysoká citlivost qPCR spojena s omezenou přesností při smíšeném chimérismu, doporučuje se pro vzorky smíšeného chimérismu analýza pomocí kitu Mentype[®] **DIPscreen** (směrnice o alogenní transplantaci kmenových buněk Německé asociace pro transplantaci kostní dřeně a krve (DAG-KBT), Bader *et al.* 2016).

3. Popis produktu Mentype[®] DIPquant

Specifické Singleplex testy Mentype[®] **DIPquant** lze použít k individuální analýze 55 DIP alel a dvou chromozomálních oblastí spojených s Y (srov. Tabulka 1). Reference (REF) pro relativní kvantifikaci je gen β -globinu. Parametry qPCR jsou nastaveny univerzálně, aby analýza různých testů Mentype[®] **DIPquant** specifických pro příjemce a analýza více vzorků pacientů mohla být provedena paralelně v jednom běhu qPCR.

Chimérismus se počítá podle $\Delta\Delta$ metody Cp [Cp (*crossing point*) přístroje Lightcycler[®] qPCR firmy Roche a odpovídá hodnotě Ct (*cycle threshold*) jiných přístrojů qPCR]. Pro relativní kvantifikaci chimerismu je proto zapotřebí kvantifikace **referenčního genu** β -globinu (*house-keeping*), které probíhá paralelně s kvantifikací cílového lokusu příjemce.

Pro kalibraci analýzy musí být analyzována recipientní DNA izolovaná před transplantací (**Kalibrátor**), společně s referenčním testem (β -globin) a příslušným qPCR testem specifickým pro příjemce (srov. Kapitola 9.1).

3.1 Nástroj qPCR

Testy Mentype® **DIPquant** byly ověřeny a validovány na přístroji real-time PCR Lightcycler® 480 II (Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, CH).

Používání testů Mentype® **DIPquant** na jiných přístrojích qPCR musí uživatel ověřit a verifikovat.

3.2 Typ vzorků

Mentype® **DIPquant** byl validován citrátovou DNA izolovanou z plnohodnotné krve.

Produkt Mentype® **DIPquant** je validován pro použití 250 ng DNA na reakci. Použití větších množství DNA musí být uživatelem validováno.

3.3 Senzitivita/specifičnost

3.3.1 Rozsah měření chimérismu

Díky technologii je optimální rozsah měření vzorků chimérismu pomocí testů Mentype® **DIPquant** qPCR mezi 0,05 % - 12,5 % měřeného obsahu DNA příjemce nebo dárce ve vzorku pacienta (smíšený vzorek). V této oblasti lze použít nastavení qPCR, jak je popsáno v kapitole 9.2. Pro vzorky s > 12,5 % měřeného obsahu DNA příjemce nebo dárce, jakož i pro smíšené chimerické vzorky, se doporučuje zvýšit počet replikátů nebo použít Mentype® **DIPscreen**.

3.3.2 Citlivost a specifičnost

Detekční limit a citlivost kitu Mentype® **DIPquant** závisí na kvalitě a množství použité templátové DNA. Tabulka 1 ukazuje citlivost alelově specifických Mentype® **DIPquant** markerů ve směsích DNA. Směsi byly použity s množstvím 250 ng DNA; deficitní DNA byla homozygotní pro alelově specifický Mentype® **DIPquant** marker.

Maximální hodnota C_p uvedená v Tabulka 1 udává rozsah, do kterého lze specificky vyhodnotit signály odpovídající testům Mentype® **DIPquant**.

Tabulka 1 Specifické detekční linie testů Mentype® DIPquant

Citlivost a specifčnost testů Mentype® DIPquant								
Buněčný ekvivalent DIP alely / PCR	5		10		20		80	
Koncentrace [pg/PCR]	31,5	Hodnota max. Cp	63	Hodnota max. Cp	126	Hodnota max. Cp	500	Hodnota max. Cp
Podíl na 250 ng/PCR [%]	0,013		0,025		0,05		0,2	
23-I	36,7		67-I	37,7	82-I	33,5	79-I	31,1
38-I	36,3		82-D	33,9	105-D	33,7	152-D	35,5
48-I	36,5		84-D	38,0	140-I	35,0		
53-D	37,5		101-I	37,4	301-D	32,5		
53-I	35,0		103-D	37,2				
67-D	36,2		104-D	34,1				
70-D	32,5		131-D	33,6				
70-I	35,6		131-I	34,2				
84-I	37,3		305-D	33,9				
88-D	35,6							
88-I	31,6							
91-D	34,1							
91-I	35,2							
97-I	36,4							
101-D	35,7							
103-I	36,6							
104-I	35,5							
105-I	34,5							
106-D	36,9							
106-I	34,2							
110-I	35,6							
112-I	34,8							
114-D	35,5							
114-I	37,4							
116-D	35,9							
116-I	34,6							
128-D	35,4							
128-I	32,7							
133-I	35,9							
134-D	35,3							
134-I	35,6							
163-D	35,2							
163-I	35,0							
301-I	35,9							
304-D	36,0							
305-I	35,6							
307-D	35,9							
307-I	37,5							
310-D	36,3							
REF	36,0							
SMCY	36,3							
SRY	36,6							

4. Výstrahy a bezpečnostní upozornění

Vezměte prosím na vědomí bezpečnostní listy (MSDS) produktů Biotype®, které vám rádi zašleme na požádání (support@biotype.de). Ohledně bezpečnostních listů reagensů, které nejsou součástí testovací sady, se obraťte na příslušného výrobce.

Před použitím produktu si pozorně přečtěte návod k použití.

Po přijetí zkontrolujte produkt a jeho komponenty, zda jsou úplné, pokud jde o počet, typ a náplň (viz kapitola 5.1), správné označení, statut zmrazení a neporušenost balení reagensů.

Při použití testů noste rukavice, laboratorní plášť a popř. ochranu očí.

Zabraňte kontaminaci vzorků nukleázou (DNáza / RNáza) použitím jednorázových DNáza / RNáza – free, aerosol - nepropustných pipetových špiček s filtry.

Použijte oddělené pracovní prostory pro přípravu vzorků (pre-PCR), namíchání mastermixu a následnou úpravu vzorků a analýzu (post-PCR). Pozitivní kontroly skladujte v prostoru odděleném od dalších komponentů kitu.

Podle směrnic nebo požadavků místních, státních a / nebo federálních předpisů či akreditačních organizací mohou být potřebné dodatečné kontroly.

Nepoužívejte komponenty kitu, které překročily datum expirace a šarže nemíchejte.

Odpady ze vzorků a testů likvidujte podle místních bezpečnostních ustanovení.

Do šarže DIP01113 (Reaction Mix D šarže CH1900491)

V této soupravě jsou obsaženy následující potenciálně nebezpečné látky:

Složka sady	Chemikálie	Nebezpečí
Reaction Mix D	Azid sodný NaN ₃	Toxický při požití, při kontaktu s kyselinou vyvíjí toxické plyny

4.1 Zajištění kvality

Celý obsah testovací soupravy podléhá intenzivní kontrole kvality společností Biotype GmbH. Kvalita testovacích souprav je průběžně přezkoumávána, aby se prokázala jejich neomezená použitelnost. V případě dotazů na kontrolu kvality nás prosím kontaktujte na e-mailovou adresu support@biotype.de.

5. Materiály dodané společně se sadou

5.1 Obsah sady

Soupravy Mentype® **DIPquant** obsahují následující složky dostatečné k provedení až 100 reakcí.

Tabulka 2 Velikost balení a obsažené komponenty kitu Mentype® **DIPquant**, * k dispozici pouze jako referenční test Mentype® **DIPquant**, # xxx definuje číslo položky specifické pro lokus

Titulek	Obsah	Objem na velikost balení	
		25 reakcí	100 reakcí*
Nuclease-Free Water	Voda neobsahující nukleázy	1,5 mL	2 x 1,5 mL
Reaction Mix D	Reakční směs D	125 µL	500 µL
Mentype® DIPquant			
-HLDxxx#-D/-I Primer Mix	Směs primerů	63 µL	250 µL
-SRY Primer Mix			
-SMCY Primer Mix			
-Reference Primer Mix			
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Multi Taq 2 DNA polymeráza	10 µL	40 µL

Mějte na paměti, že komponenty soupravy z různých šarží soupravy nesmí být smíchány. Přehled čísel šarží je uveden na etiketě, která je umístěna na vnitřní straně klopky krabice. Rozdělování komponent soupravy do jiných reakčních nádob není povoleno.

5.2 Informace pro objednání

Písemnou objednávku prosím zašlete e-mailem na sales@biotype.de. Objednávka musí obsahovat objednací čísla podle Poznámka: Mějte prosím na paměti, že reakce o velikosti balení 50 se již neprodávají.

Tabulka 3 a Tabulka 13, strana 21.

Poznámka: Mějte prosím na paměti, že reakce o velikosti balení 50 se již neprodávají.

Tabulka 3 Obecná forma objednacích čísel testů Mentype® **DIPquant**, * xx definuje objednací číslo testu Mentype® **DIPquant** specifického pro lokus

Mentype® DIPquant	25 reakcí	Obj. č.	45-015xx* -0025 (*srov. Tabulka 13)
Mentype® DIPquant	100 reakcí	Obj. č.	45-01591-0100
Reference			

5.3 Požadované reagensie a vybavení nejsou součástí kitu

Pro selekci informativních dárcovských a dle pacienta specifických testů Mentype® **DIPquant** v multiplexní PCR je k dispozici následující kit:

Tabulka 4 Informace pro objednání kytu Mentype® **DIPscreen**, * yyy definuje velikost balení

Reagent	Dodavatel	Objednací číslo
Mentype® DIPscreen (určování genotypu)	Biotype GmbH	45-45410-0yyy*

Upozornění: Místa nasedání primerů u kytu Mentype® **DIPquant** se liší od míst nasedání primerů v kytu Mentype® **DIPscreen**. Ve vzácných případech mohou mutace, které se vyskytují v místech nasedání primerů, způsobit alelické výpadky (*allelic dropouts*). Z tohoto důvodu mohou mezi testy Mentype® **DIPquant** a Mentype® **DIPscreen** nastat genotypové rozdíly. Výsledky Mentype® **DIPscreen** by proto měly být vždy verifikovány předem vybranými informativními testy Mentype® **DIPquant** ověřením před tím, než se použijí při monitorování chimerismu (viz také kapitola 9.1).

Pro amplifikaci qPCR jsou vyžadovány následující reagenty a přístroje:

- Vhodný přístroj real-time PCR (viz kapitola 3.1)
- Vhodná souprava pro izolaci DNA (srov. Kapitola 7.2.1)
- Vhodný nástroj pro kvantitativní měření koncentrace DNA po izolaci a čištění (srov. kapitola 7.2.1)
- Stolní centrifuga s rotorem pro 2 mL reakční zkumavky
- Mikrotitrační destičky s 96 jamkami nebo reakční zkumavky, v případě použití mikrotitračních destiček s 96 jamkami vhodná víka nebo fólie, centrifuga s rotorem na mikrotitrační destičky
- Vortex, vhodný pro mikrotitrační destičky s 96 jamkami nebo pro 0,2 mL reakčními zkumavky
- pipety, pipetové špičky s filtry (jednorázové)
- jednorázové rukavice bez pudru

Upozornění: Zajistěte, aby byly všechny přístroje instalovány, udržovány a kalibrovány podle podmínek výrobce. Ujistěte se, že jsou přítomny všechny reagenty pro ovládání příslušného přístroje qPCR (viz návod k použití od příslušného výrobce nástroje).

6. Skladování

Testy Mentype® **DIPquant** se dodávají na suchém ledu. Složky testů budou doručeny zmrazené. Pokud by jedna nebo více složek nebyla po obdržení zmrazená, nebo pokud by došlo k poškození zkumavek během přepravy, obraťte se pro další podporu na společnost Biotype GmbH (support@biotype.de).

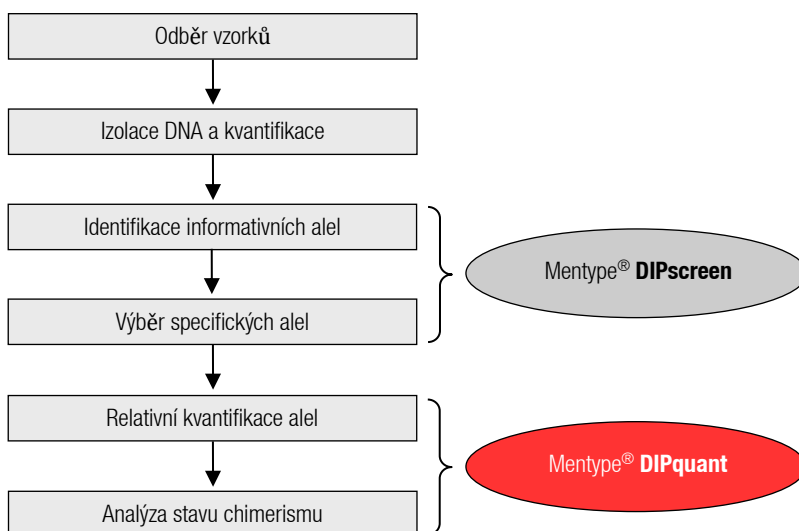
Komponenty musejí být skladovány při $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení. Maximální počet 8 cyklů rozmrazení a zmrazení nesmí být překročen.

Soupravy Mentype® **DIPquant** by měly být skladovány chráněně před světlem.

Trvanlivost zkušební soupravy je uvedena na etiketě obalu.

7. Pracovní postup

7.1 Přehled analýzy chimérismu produkty Mentype®DIP



Obrázek 1 Od vzorkování po analýzu - analýza chimérismu pomocí Mentype® **DIPscreen** a Mentype® **DIPquant**

7.2 Příprava vzorků a množství použité DNA

7.2.1 Izolace DNA

Kvalita izolované DNA má rozhodující vliv na parametry a kvalitu celého testovacího systému. Musí být zajištěno, že systém používaný pro izolaci DNA je kompatibilní s technologií qPCR.

Pro izolaci DNA jsou vhodné následující kity:

- NucleoSpin® Blood L (Macherey Nagel GmbH, Düren, DE)

- QIAamp® DNA Blood Midi Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE)

Pro izolaci DNA mohou být použity také alternativní kity, ale jejich vhodnost musí být ověřena uživatelem.

Upozornění: Pro získání přesných výsledků je nutná kvantifikace DNA (např. UV / VIS spektroskopickou kvantifikací DNA při A260 nm a stanovení kvality pomocí poměru A260 / A280, který by měl být mezi 1,7 a 2,0).

7.2.2 Templátová DNA

Alelicky specifická směs primerů je optimalizována pro použití 250 ng purifikované DNA, což odpovídá použití 41 666 buněk (6 pg DNA / buňka). Pro optimální výsledky se doporučuje použít 250 ng DNA.

7.3 Příprava master mixu

Všechny reagentie by měly být před přidáním do mastermixu dobře promíchány (vortexovány) a krátce centrifugovány (cca 10 s).

Množství použité DNA závisí na její koncentraci. Pro dosažení optimálních výsledků doporučujeme kvantitu přidané DNA upravit na 250 ng DNA na reakci.

Celkový objem PCR reakce by měl být vždy 25 µL.

Zvažte pozitivní a negativní kontroly pro počet reakcí qPCR, které mají být použity v analýze. Přidejte k celkovému objemu jednu nebo dvě reakce pro kompenzaci chyb pipetování.

Následující tabulka ukazuje objemy jednotlivých reagentů kitu při použití s 5,0 µL vzorku (templátové DNA) a v reakčním objemu 25 µL.

Tabulka 5 Složení Mastermixu pro reakci Mentype® **DIPquant** při použití 5 µL DNA

Komponenty	Objem na dávku qPCR
Nuclease-Free Water	12,1 µL
Reaction Mix D*	5,0 µL
Mentype® DIPquant Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Celkový objem mastermixu	20,0 µL
Templát DNA (50 ng/µL)	5,0 µL

* obsahuje Mg²⁺, dNTPs, BSA

Upozornění: DNA řed'te a uchovávejte v 1 x TE (10 mM Tris HCl, pH 8,0 a 1 mM EDTA) nebo 0,1 x TE nebo ve vodě neobsahující nukleázy.

7.3.1 Pozitivní kontrola

Pro pozitivní kontrolu použijte místo templátové DNA 5 µL otypované, alelově specifické kontrolní DNA (5 ng/µL). Pipetujte kontrolní DNA namísto templátové DNA do zkumavek obsahujících mastermix qPCR.

Následující přehled ukazuje objemy složek soupravy použité s 5,0 µL kontrolní DNA a reakční objem 25 µL.

Tabulka 6 Složení Mastermixu pro reakci Mentype® **DIPquant** při použití 5 ng/µL vzorku pozitivní kontroly

Komponenty	Objem na dávku qPCR
Nuclease-Free Water	12,1 µL
Reaction Mix D*	5,0 µL
Mentype® DIPquant Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Celkový objem mastermixu	20,0 µL
Kontrolní DNA (5 ng/µL)	5,0 µL

* obsahuje Mg²⁺, dNTPs, BSA

7.3.2 Negativní kontrola

Jako negativní kontrolu napipetujte 5 µL vody bez nukleázy místo templátové DNA do zkumavek obsahujících mastermix qPCR.

Následující tabulka znázorňuje objemy komponent kitu při použití 5,0 µL vody (nuclease-free), v reakčním objemu 25 µL.

Tabulka 7 Složení Mastermixu pro reakci Mentype® **DIPquant** při použití 5 µL negativní kontroly (vody)

Komponenty	Objem na dávku qPCR
Nuclease-Free Water	12,1 µL
Reaction Mix D*	5,0 µL
Mentype® DIPquant Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Celkový objem mastermixu	20,0 µL
„Voda neobsahující nukleázy“	5,0 µL

* obsahuje Mg²⁺, dNTPs, BSA

7.4 Reakční objem

Pipetujte 20 µL reakční směsi qPCR do zkumavek (optické destičky) nebo do vícejamkové destičky (optické vícejamky). Pak přidejte 5 µL specifické DNA (viz schéma pipetování v kapitolách 9.1 a 9.2) nebo 5 µL pozitivní nebo negativní kontroly.

Pokud je to možné, pro přístroj qPCR by měly být použity bílé destičky nebo zkumavky, protože to zajistí účinnou detekci fluorescenčních signálů. Optimalizovaná detekce fluorescence může zvýšit citlivost testu.

Po pipetování by měly být zkumavky nebo vícejamkové destičky spolehlivě uzavřeny (optické uzávěry, optická těsnění).

Krátce odstřed'te a poté vložte do přístroje pro analýzu.

8. Program qPCR a amplifikace

8.1 Nastavení přístroje a parametry amplifikace

Pomocí níže uvedených parametrů vytvořte protokol pro amplifikaci a detekci qPCR. Nastavení pro konkrétní přístroj naleznete v příručce příslušného výrobce přístroje nebo se obraťte na naši technickou podporu (support@biotype.de).

8.2 Parametry detekce

6-FAM slouží jako referenční fluorescenční barvivo pro všechny testy. Věnujte pozornost výběru správné sady filtrů v softwaru přístroje real-time PCR.

8.3 Parametry amplifikace qPCR*

Multi Taq2 polymeráza je při nižší teplotě reverzibilně inaktivní, což slouží k potlačení tvorby nespecifických amplifikačních produktů. Pro aktivaci enzymu by měl být proveden „**hot start**“.

Tabulka 8 qPCR Amplifikační parametry pro provádění testů Mentype® DIPquant

Teplota	Čas	
94 °C	4 min (hot start pro aktivaci Multi Taq 2 DNA polymerázy)	
94 °C	30 s	45 cyklů
62 °C	45 s	

* Validováno pomocí Roche Light Cycler® LC480 (se standardními rychlostmi zahřívání přibližně 4,4 °C/s a rychlostí chlazení 2,2 °C/s).

Ke sběru dat by mělo dojít během fáze annealingu primerů a během elongace při 62 °C. Vytvořte protokol testování vzorky s příslušným nastavením analýzy.

9. Doporučené nastavení analýzy

Za účelem řešení optimálního měřicího rozsahu qPCR by měl být změřen podíl recipienta ve smíšeném vzorku (viz kapitola 3.3.1)

Pro relativní kvantifikaci chimerismu se doporučuje příprava testů qPCR podle následujícího schématu:

- **3 různé alely specifické pro recipienta** („allele of interest“, AOI) v **duplikátech** (viz Tabulka 9, Tabulka 12, Tabulka 13), **nebo**
- **2 různé alely specifické pro recipienta** („allele of interest“, AOI) v **triplikátech** (viz Tabulka 10)
- Podle DNA a času, musí být **aktivní reference** (REF, β -globin) měřena alespoň v **duplikátech** (lépe v triplikátech)
- **negativní (NTC)** a **pozitivní kontrola (PC)** by měla být součástí každého testování

Tabulka 9 Nastavení 1: Použití 3 specifických Mentype® DIPquant v duplikátech a Mentype® DIPquant referenčního testu v triplikátech

Test	Replikace	Počet vyšetřovaných lokusů
Specifické testy DIPquant	2	3
Referenční test (β -globin)	3	-

Tabulka 10 Nastavení 2: Použití 2 specifických Mentype® DIPquant v triplikátech trojím vyhotovení a Mentype® DIPquant referenčního testu v triplikátech

Test	Replikace	Počet vyšetřovaných lokusů
Specifické testy DIPquant	3	2
Referenční test (β -globin)	3	-

9.1 Kvantifikace před transplantací (pre-HSCT)

DNA recipienta před transplantací (kalibrátor pre-HSCT) by měla být analyzována společně s referenčním testem (β -globinový gen) a příslušnými qPCR testy specifickými pro recipienta pro kalibraci analýzy. Hodnota této kvantifikace je stanovena jako 100 % podílu recipienta.

Pro zajištění specifičnosti qPCR testů specifických pro recipienta by měla být provedena analýza DNA dárce. To odpovídá 0 % podílu recipienta.

Tabulka 11 Příklad nastavení vícejamkové destičky před transplantací (kalibrátor)

	1	2	3	4
A	Ref preTx	AOI-1 preTx	AOI-2 preTx	AOI-3 preTx
B	Ref preTx	AOI-1 preTx	AOI-2 preTx	AOI-3 preTx
C	Ref NTC	AOI-1 NTC	AOI-2 NTC	AOI-3 NTC
D	Ref PC	AOI-1 PC	AOI-2 PC	AOI-3 PC
E		AOI-1 Dárce*	AOI-2 Dárce*	AOI-3 Dárce*
F		AOI-1 Dárce*	AOI-2 Dárce*	AOI-3 Dárce*

Ref: Referenční test; AOI 1-3: Test specifický pro recipienta; preTx: Vzorek recipienta jako kalibrátor; Dárce *: Volitelný vzorek dárce jako test specifičnosti; NTC: Žádná kontrola šablon; PC: Pozitivní kontrola

9.2 Kvantifikace po transplantaci / sledování (po HSCT)

Chimérické monitorování by mělo být prováděno s DNA pacienta, která byla čerstvě izolována v příslušných časech monitorování. Pro bezpečnou analýzu by měla být zahrnuta reference, tři alely specifické pro recipienta, jakož i pozitivní a negativní kontroly (viz níže).

Tabulka 12 Příklad nastavení vícejamkové destičky po transplantaci (sledování)

	1	2	3	4
A	Ref Monitorování 1	AOI-1 Monitorování 1	AOI-2 Monitorování 1	AOI-3 Monitorování 1
B	Ref Monitorování 1	AOI-1 Monitorování 1	AOI-2 Monitorování 1	AOI-3 Monitorování 1
C	Ref NTC	AOI-1 NTC	AOI-2 NTC	AOI-3 NTC
D	Ref PC	AOI-1 PC	AOI-2 PC	AOI-3 PC

Ref: Referenční test; AOI 1-3: Testy specifické pro recipienta; Sledování 1: První monitorovací vzorek po transplantaci; NTC: Žádná kontrola šablon; PC: Pozitivní kontrola;

10. Vyhodnocení

10.1 Analýza dat

Prohlédněte amplifikační křivky celého běhu qPCR. Podrobný proces analýzy nezpracovaných dat závisí na použitém přístroji real time PCR.

Definice prahové hodnoty „baseline noise levels“ by měla být stanovena automaticky, nebo by měla být předdefinovaná pro specifické cykly (např. 3-15). K určení prahové hodnoty použijte **NTC**.

Protože se pro kvantifikaci používá metoda $\Delta\Delta C_p$, nemají individuálně nastavené hodnoty thresholdu žádný vliv na výsledky, pokud jsou analyzovány všechny testy na vzorku se stejným thresholdem.

Informace o exportu a zpracování dat naleznete v příručce výrobce zařízení real-time PCR. Exportujte název vzorku „Název vzorku“ a hodnoty C_p pro následné výpočty.

10.2 Kontrola výsledků

QPCR byla úspěšná, když jsou hodnoty C_p pozitivní kontroly vyhodnotitelné podle hodnot v Tabulka 1 a negativní kontrola je bez amplifikace < 45 cyklů.

Pomocí donorové DNA pro kontrolu specifčnosti testu by neměly být detekovatelné žádné signály s hodnoty C_p nižšími než je znázorněno v Tabulka 1.

11. Kvantifikace

Pokud údaje vyhodnocujete ručně, použijte metodu relativní kvantifikace. Individuálně nastavené prahové hodnoty (threshold) během analýzy prvotních dat nemají žádný vliv na kvantifikaci metodou $\Delta\Delta C_p$, pokud jsou analyzovány všechny testy na vzorku se stejným thresholdem.

Pomocí **NTC** vyhledejte vhodný threshold.

Výpočet

11.1 Kvantifikace vzorků před HSCT

1. Vypočítejte jednotlivé hodnoty C_p pro referenční (REF) a cílové sledované alely (AOI) pro DNA recipienta
2. Vypočítejte ΔC_p pro každý AOI pro REF ($\Delta C_p C = C_p AOI - C_p REF$)
3. ΔC_p vrátí hodnotu kalibrátoru ($\Delta C_p C$) ve výpočtu po HSCT (100% příjemce)

11.2 Kvantifikace vzorků po HSCT

1. Vypočítejte jednotlivé hodnoty C_p pro referenční (REF) a cílové sledované alely (AOI) pro DNA pacienta
2. Vypočítejte ΔC_p pro každý AOI pro REF ($\Delta C_p C = C_p AOI - C_p REF$)
3. Tato ΔC_p hodnota se používá pro výpočet neznámého stavu ($\Delta C_p U$)
4. Vypočítejte $\Delta\Delta C_p$ pro kvantifikaci chimerismu ($\Delta\Delta C_p = \Delta C_p U - \Delta C_p C$)
5. Vypočítejte % složky recipienta v závislosti na účinnosti qPCR; % recipienta = $((1+E)^{-\Delta\Delta C_p}) \times 100$. Pokud je účinnost qPCR 100 %, použijte následující vzorec: $(2^{-\Delta\Delta C_p}) \times 100$.

12. Interpretace neobvyklých výsledků

12.1 Nízká síla signálu nebo bez detekovaného signálu

Do reakční směsi nebyla přidána jedna nebo více složek: Zkontrolujte amplifikaci pozitivní kontroly a v případě potřeby opakujte qPCR.

Pro analýzu byl použit nesprávný test: Ujistěte se, že alelově-specifické testy jsou kompatibilní s testy, specifickými pro příjemce.

Suboptimální podmínky qPCR: Zkontrolujte nastavení qPCR. Zajistěte, aby proběhla aktivace Multi Taq2 DNA polymerázy při 94 °C po dobu 4 min. Zkontrolujte teplotu annealingu a elongace. Ujistěte se, že rychlost ohřevu přístroje je nastavena na 4 °C/s a rychlost ochlazování přístroje je nastavená na 2 °C/s.

QPCR byla inhibována: Po extrakci DNA nebyly inhibitory PCR úplně odstraněny. Nezapomeňte proto DNA důkladně purifikovat podle pokynů výrobce soupravy. Purifikujte DNA znovu nebo zřeďte vzorek. Opakujte qPCR s purifikovanou nebo zředěnou DNA.

Získání dat se nezdařilo: Ujistěte se, že sběr fluorescenčních dat byl proveden ve správném fluorescenčním kanálu ve správný čas. Zkontrolujte nastavení přístroje na fluorescenční barvu použitou v testu (6-FAM a ROX).

Problémy s baseline, nebo s thresholdem: Nastavte threshold nad nespecifickým pozadím, abyste získali přesné hodnoty C_p. Použijte postup uvedený v příručce od výrobce přístroje qPCR. Pokud je to možné, ručně upravte nastavení baseline a thresholdu.

Degradace templátové DNA: Během přípravy vzorku a během skladování může dojít k degradaci DNA. DNA skladujte v 1 x nebo 0,1 x TE nebo ve vodě (nuclease-free). Použijte kontrolní DNA ke kontrole celkového chování testu.

Degradace komponent qPCR: Zkontrolujte expiraci použitých reagentů a podmínky jejich skladování. Vyvarujte se častému zamrzání a rozmrazování směsi primerů > 8 cyklů a ujistěte se, že složky jsou skladovány při -25 °C až -15 °C.

12.2 Kolísání síly signálu v replikátech

Chyba pipetování: Chybě pipetování se vyhnete pravidelnou kontrolou pipetové sady.

Variace v Master Mixu: Při přidávání reakční směsi přidejte 1-2 další reakce navíc, abyste nahradili nepřesnosti pipetování. Komponenty důkladně promíchejte krátkým vortexováním a krátkým odstředováním (10 s). Pipetujte nejméně 5 µL templátové DNA.

qPCR byla inhibována: Během izolace DNA nebyly inhibitory PCR úplně odstraněny. Proto se ujistěte, že izolace DNA je prováděna pečlivě podle pokynů výrobce. Purifikujte DNA znovu nebo ji nařeďte. Opakujte qPCR s purifikovanou / zředěnou DNA.

Baseline nebo threshold byly nastaveny nesprávně: Chcete-li získat přesné hodnoty C_p , nastavte threshold nad nespecifickým pozadím. Použijte postup popsáný v příručce výrobce vašeho přístroje qPCR. Pokud je to možné, ručně upravte nastavení baseline a threshold.

Nízká citlivost: Použití příliš malého množství DNA (optimálně 250 ng) může snížit citlivost a reprodukovatelnost v replikátech. Kvantifikujte použitou DNA a měřte její kvalitu odpovídajícími metodami podle doporučení v kapitole 7.2.1.

Signály v negativní kontrole: Abyste předešli kontaminaci, použijte špičky s filtry které jsou nepropustné pro aerosoly. Spust'ete novou qPCR s nuclease-free vodou. Reagencie před a po PCR skladujte odděleně. Pokud je to možné, pipetujte reakční směs a DNA v různých místnostech.

12.3 Signály testů specifických pro recipienta v DNA dárce

Použití příliš velkého množství (> 250 ng) templátové DNA: Snižte množství templátové DNA na 250 ng. Před testováním musí být stanovena koncentrace DNA.

Výskyt falešně negativních signálů: Ve vzácných případech může mutace vyskytující se v místech nasedání primeru vést k alelickým „výpadkům“. Genotypizace pomocí Mentype® **DIPscreen** může vést k falešně negativním výsledkům (viz kapitola 5.3, 9.1). Protože místa nasedání primerů v testech Mentype® **DIPquant** se liší od míst v testech Mentype® **DIPscreen**, může být qPCR stále pozitivní. To musí být ovšem ověřeno při monitoringu chimerismu před aplikací alelově-specifické analýzy DIPquant.

13. Objednací informace

Tabulka 13 Podrobné objednáací informace pro alelově-specifické testy Mentype® **DIPquant**, * k dispozici také ve velikosti balení 100 reakcí (45-01591-0100)

Test DIPquant	25 reakcí
Reference*	45-01591-0025
SRY	45-01590-0025
SMCY	45-01589-0025
HLD23-I	45-01538-0025
HLD38-I	45-01558-0025
HLD48-I	45-01560-0025
HLD53-D	45-01561-0025
HLD53-I	45-01562-0025
HLD67-D	45-01567-0025
HLD67-I	45-01568-0025
HLD70-D	45-01569-0025
HLD70-I	45-01570-0025
HLD79-I	45-01576-0025
HLD82-D	45-01577-0025
HLD82-I	45-01578-0025
HLD84-D	45-01579-0025
HLD84-I	45-01580-0025
HLD88-D	45-01581-0025
HLD88-I	45-01582-0025
HLD91-D	45-01585-0025
HLD91-I	45-01586-0025
HLD97-I	45-01588-0025
HLD101-D	45-01501-0025
HLD101-I	45-01502-0025
HLD103-D	45-01505-0025
HLD103-I	45-01506-0025
HLD104-D	45-01507-0025
HLD104-I	45-01508-0025
HLD105-D	45-01509-0025
HLD105-I	45-01510-0025
HLD106-D	45-01511-0025
HLD106-I	45-01512-0025
HLD110-I	45-01514-0025

HLD112-I	45-01516-0025
HLD114-D	45-01517-0025
HLD114-I	45-01518-0025
HLD116-D	45-01519-0025
HLD116-I	45-01520-0025
HLD128-D	45-01523-0025
HLD128-I	45-01524-0025
HLD131-D	45-01525-0025
HLD131-I	45-01526-0025
HLD133-I	45-01528-0025
HLD134-D	45-01529-0025
HLD134-I	45-01530-0025
HLD140-I	45-01532-0025
HLD152-D	45-01533-0025
HLD163-D	45-01535-0025
HLD163-I	45-01536-0025
HLD301-D	45-01539-0025
HLD301-I	45-01540-0025
HLD304-D	45-01541-0025
HLD305-D	45-01543-0025
HLD305-I	45-01544-0025
HLD307-D	45-01545-0025
HLD307-I	45-01546-0025
HLD310-D	45-01549-0025

14. Reference

- Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, Lamy T, Le Prise PY, Beauplet A, Bories D, Semana G, Quelvennec E, (2002)** Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 99, 4618-4625.
- Bader P, Bornhäuser M, Grigoleit U, Kröger N, (2016)** Leitlinien zur allogenen Stammzelltransplantation (SZT) von der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantationen (DAG-KBT), Kapitel X: Monitoring nach allogener SZT – Chimärismusanalyse und Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) https://www.dag-kbt.de/files/downloads/Leitlinien_Kap-10_Monitoring%20nach%20allogener%20SZT.pdf.
- Chen DP, Tseng CP, Wang WT, Wang MC, Tsai SH, Sun CF (2011)** Real-time biallelic polymorphism-polymerase chain reaction for chimerism monitoring of hematopoietic stem cell transplantation relapsed patients. *Clin Chim Acta* 412, 625-630.
- Harries LW, Wickham CL, Evans JC, Rule SA, Joyner MV, Eillard S (2005)** Analysis of haematopoietic chimaerism by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bone Marrow Transplant* 35, 283-290.
- Masmas TN, Madsen HO, Petersen SL, Ryder LP, Svejgaard A, Alizadeh M, Vindelov LL (2005)** Evaluation and automation of hematopoietic chimerism analysis based on real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biol Blood Marrow Transplant* 11, 558-566.
- Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, Devine SE (2006)** An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human Genome. *Genome Res* 16,1182-1190.
- Qin XY, Li GX, Qin YZ, Wang Y, Wang FR, Liu DH, Xu LP, Chen H, Han W, Wang JZ, Zhang XH, Li JL, Li LD, Liu KY, Huang XJ (2011)** Quantitative assessment of hematopoietic chimerism by quantitative real-time polymerase chain reaction of sequence polymorphism systems after hematopoietic stem cell transplantation. *Chin Med J (Engl.)* 124, 2301-2308.
- Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G (2002)** Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet* 71, 854-862.
- Wilhelm J, Reuter H, Tews B, Pingoud A, Hahn M (2002)** Detection and quantification of insertion/deletion variations by allele-specific real-time PCR: application for genotyping and chimerism analysis. *Biol Chem* 383, 1423-1433.

15. Ochranné známky a vyloučení odpovědnosti

Registrované názvy, značky atd., použité v tomto dokumentu, nelze považovat za nechráněné, i když nejsou jako registrované výslovně označeny: Biotype[®], Mentype[®] (Biotype GmbH); LightCycler[®] (Roche Diagnostics International AG); QIAamp[®] (QIAGEN GmbH); NucleoSpin[®] (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG); FAM[™], ROX[™] (Life Technologies Ltd.).

Testy Mentype[®] **DIPscreen** a Mentype[®] **DIPquant** jsou soupravy označené značkou CE podle evropské směrnice in vitro 98/79 / ES. Sady nejsou dostupné jako diagnostika in vitro mimo tuto regulační oblast.

16. Symboly



Výrobce



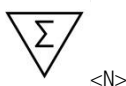
Odkaz na eIFU



Objednáací číslo



Diagnostika in vitro



Dostatečné pro testy <N>



Lze použít do



Omezení teploty



Udržujte v suchu



Chraňte před světlem



Označení šarže

Ověření a validace amplifikačních kitů qPCR Mentype® DIPquant

A Analytické údaje o výkonu (ověření)

A a) Lidská DNA

Pro všechny ověřovací experimenty byla použita biobanka z více než 100 vzorků lidské DNA připravených z žilní krve ETDA. Vzorky pocházely od nepřibuzných zdravých dobrovolníků, kteří dali svůj písemný souhlas. Preatalytika, izolace DNA a kvantifikace DNA viz kapitola B b).

A b) Analytická specifčnost a Limit slepého pokusu (LoB)

Cíl: Produkt sestává z 57 testů na autozomální bialelické markery, dvou Y chromozomálních markerů a referenčního genu. Specifičnost alelických a Y chromozomálně specifických testů Mentype® DIPquant musí být zajištěna v přítomnosti přebytku alternativní alely nebo chromozomu X definovaného produktem.

Metodika: Pro každý test Mentype® DIPquant byla shromážděna data qPCR z kontrol bez templátu (NTC, $n \geq 12$) a z kontrol s 250 ng homozygotní DNA pro alternativní alelu, nebo data z qPCR při použití 250 ng ženské DNA (v případě markerů specifických pro Y) ($n \geq 9$). Tato qPCR data by neměla být detekována.

Výsledky: U všech NTC nebyly zaznamenány falešně pozitivní signály před 45 cykly. V případě 250 ng homogenní DNA pro alternativní alelu nebo samičí DNA, testy Mentype® DIPquant qPCR neprokázaly žádné signály před 45 cyklem. Další testy ukázaly nespecifické signály před 45 cyklem. Při 9 paralelních měřeních však bylo pozorováno stochastické rozdělení mezi 1 a 6 falešně pozitivních výsledků. Proto byl pro výpočet LoB použit neparametrický analytický přístup (CSLI 2012, data neuvedená).

A c) Analytická citlivost a mez detekce (LoD)

Cíl: Byly provedeny experimenty k určení analytického detekčního limitu (LoD) všech testů qPCR.

Metodika: Výpočet, zda LoD splňuje kritérium kvality pro vyloučení falešně pozitivních výsledků, byl vypočten pomocí rovnice $LoB - (LOD + 2 \times \delta) \geq 2$, kde LoB je hodnota C_p stanovená podle A a) se stanoví neparametricky; LoD je střední hodnota C_p pozitivních měření; δ je standardní odchylka LoD. Směsi DNA byly vytvořeny pro všechny alelové specifické testy s použitím 250 ng homozygotní DNA pro alternativní alelu nebo 250 ng ženské DNA (v případě markerů specifických pro Y) na PCR reakci a různá množství homozygotní DNA alely, která má být detekována. Počet opakování byl 6 (3 ve dvou různých dnech).

Výsledky: Nejprve se přidalo 31,5 pg DNA cílové alely, která se má detekovat (což odpovídá 0,01 % podílu alely). Další experimenty s 63 pg (0,025 % podíl

alely), 126 pg (0,05 % podíl alely) a 500 pg, v tomto pořadí (0,2 % podíl alely) byly provedeny v případech, kdy nebylo splněno kritérium přijatelnosti kvality. Výsledky všech testů qPCR jsou uvedeny v tabulce 1.

A d) Měřící rozsah testů

Cíl: Byl stanoven lineární rozsah testů.

Metodika: Experimenty zahrnovaly všechna data z A b) a A c). Kromě toho byla měřena sériová ředění rekombinantních plasmidů kódujících DNA oblasti alel, které mají být detekovány, v rozmezí 5 až 5 120 kopií na reakci. Bylo provedeno celkem 11 ředění včetně kontrol bez templátu (NTC) a počet replikátů byl 6 (3 ve dvou různých dnech).

výsledky: Pro všechny testy byl definován rozsah lineárního měření $24 \leq C_p \leq LOD$. Hodnota C_p 24 s 5 120 kopiemi cílové alely odpovídá 12,5 % deficientní DNA ve směsi s celkem 250 ng DNA na reakci.

A e) Variace mezi šaržemi a testování parametrů testu v LoD

Cíl: Koncentrační poměry složek PCR pufru Reaction Mix D polymerázy Multi Taq 2 jsou kritické pro citlivost, specifčnost a rovnováhu signálů v qPCR. Byl testován vliv variací (různé šarže) na výše uvedené komponenty kitu.

Metodika: Byly testovány čtyři šarže reakční směsi D a tři šarže DNA Multi Taq 2 DNA. Testy Mentype® **DIPquant** HLD53-I, Mentype® **DIPquant** HLD84-I, Mentype® **DIPquant** HLD101-I, Mentype® **DIPquant** HLD70-D a Mentype® **DIPquant** HLD88-D byly řádně použity pro měření. qPCR byla amplifikována za standardních podmínek s kontrolní DNA (General Positive Control, Biotype GmbH) ve dvou různých koncentracích DNA (50 pg na PCR reakci a 5 ng na PCR reakci). Pro každou koncentraci byly provedeny tři paralelní vzorky. Kromě toho byly provedeny tři qPCR s NTC na každý test DIPquant a na každou šarži.

Výsledky: Výsledky jsou uvedeny v Tabulka 14 a Tabulka 15.

Tabulka 14 Rozdíl mezi čtyřmi šaržemi reakční směsi D

Test Mentype® DIPquant	5 ng templátové DNA		50 pg templátové DNA	
	Střední cp	δ	Střední cp	δ
HLD53-I	28,66	0,06	34,36	2,19
HLD84-I	28,31	0,44	36,75	2,95
HLD101-I	29,59	0,04	36,59	2,48
HLD70-D	27,83	0,05	34,46	1,26
HLD88-D	28,92	0,07	35,96	0,65

Tabulka 15 Variace mezi třemi šaržemi DNA polymerázy Multi Taq 2

Test Mentype® DIPquant	5 ng templátové DNA		50 pg templátové DNA	
	Střední cp	δ	Střední cp	δ
HLD53-I	28,54	0,11	32,21	0,85
HLD84-I	28,71	0,69	37,82	2,69
HLD101-I	29,56	0,18	34,99	0,51
HLD70-D	27,92	0,05	34,99	0,51
HLD88-D	29,01	0,09	35,79	0,52

A f) Měření ve dvou různých dnech

Cíl: Měření byla provedena ve dvou samostatných dnech, aby se demonstroval účinek pipetování dvou nezávislých hlavních směsí a přístroje na provedení testu.

Metodika: Pro simulaci potenciálních chyb pipetování uživatelem bylo $\pm 10\%$ objemových výkyvů PCR pufru a Multi Taq 2 porovnáno se standardní odpovědí ve 3 vysoce výkonných a 3 nízko výkonných qPCR testech. QPCR byl testován za standardních podmínek s kontrolní DNA (obecná pozitivní kontrola) se dvěma různými koncentracemi DNA (50 pg na PCR reakci a 5 ng na PCR reakci). Pro každou koncentraci byly provedeny tři paralelní vzorky. Kromě toho byly stanoveny tři slepé hodnoty (NTC) na test DIPquant a na šarži.

Výsledky: Možné chyby pipetování s fluktuací objemu $\pm 10\%$ neovlivňují výkon zvolených testů Mentype® **DIPquant** s 5 ng GPC. Kritérium přijatelnosti je dosaženo pro všechny testy a pro každou simulovanou pipetovací chybu. Nejsou žádné chyby a nebyly zjištěny žádné nespecifické vedlejší produkty.

Použitím 50 pg GPC na reakci jsou možné širší variace > 2 Cp. Proto je používání kalibrovaných zařízení, jako jsou pipety, povinné.

A g) Stabilita po otevření

Cíl: Stabilita reagentů soupravy qPCR byla testována po opakovaném zmrazení a rozmrazení. Toto napodobuje skutečné běžné používání produktu v simulovaném (zrychleném) procesu.

Metodika: Jako příklad byly vybrány čtyři testy Mentype® **DIPquant**. Směsi primerů a sond byly podrobeny 8 násobnému cyklu zmrazení a rozmrazení. Zmrazení bylo provedeno po dobu alespoň 30 minut při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rozmrazená byla při teplotě místnosti a reagentie byly před použitím homogenizovány protřepáním. Následně byla provedena standardní reakce. Aby se zabránilo dalšímu vlivu použitím různých DNA, byla jako templát použita kontrolní DNA (GPC). Pro test byly zvoleny dvě různé koncentrace DNA (50 pg na PCR reakci a 5 ng na PCR reakci). Pro každou koncentraci byly provedeny tři opakované vzorky. Kromě toho byly do každého testu Mentype® **DIPquant** zahrnuty tři NTC.

Výsledek: Časté zmrazení a rozmrazení nemá žádný negativní dopad na provádění testů DIPquant. Detekce pomocí směsi primer-sonda je také možná po 8 násobném zmrazení a rozmrazení. Hodnoty C_p se mění minimálně. Odchyłka je v rozsahu variability cykléru qPCR.

B Údaje o klinickém výkonu

B a) Etické a regulační aspekty

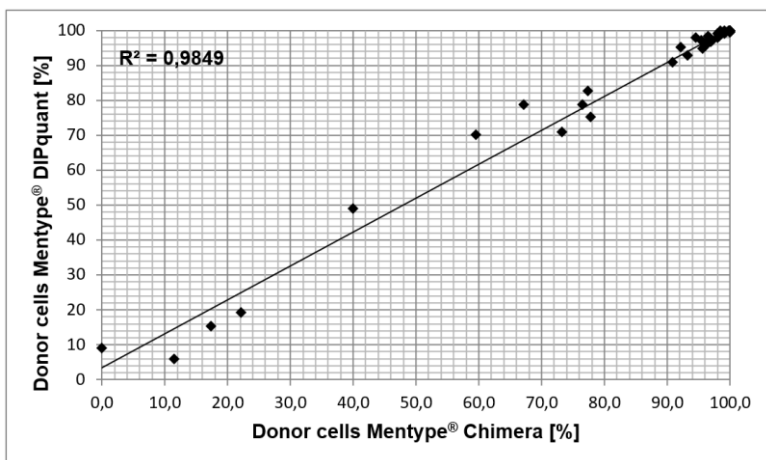
Test hodnocení výkonnosti byl proveden v souladu s článkem §§ 20 - 24 Zákona o lékařských produktech (DE). Zproštění schvalovací povinnosti pro lékařské výrobky s nízkým bezpečnostním rizikem podle § 7 nařízení o klinických zkouškách lékařských výrobků bylo uděleno Spolkovým ústavem pro léčiva a lékařské výrobky. Protokol byl schválen místní etickou komisí centra klinického hodnocení. Všichni účastníci byli dospělí, sui juris a dali svůj písemný souhlas.

B b) Preanalytika, izolace DNA a kvantifikace DNA

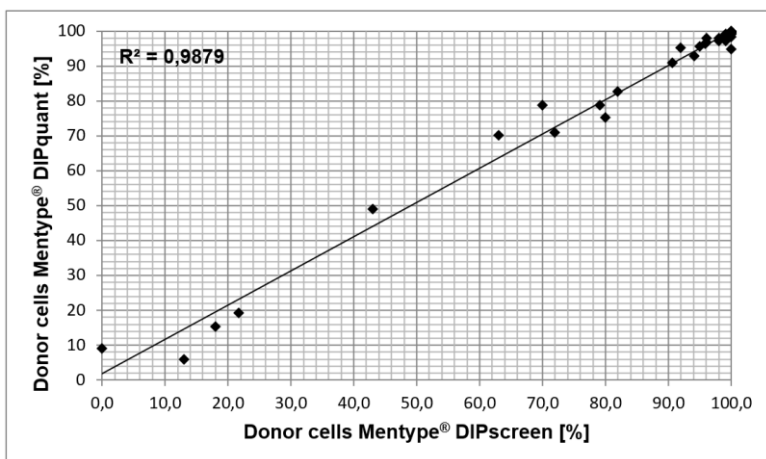
Byly použity žilní vzorky krve ETDA (např. S-Monovette K2E, Sarstedt AG & Co. KG, Nuembrecht, DE). Izolace DNA z plnohodnotné krve byla provedena pomocí soupravy QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE) podle pokynů výrobce. Koncentrace DNA byly stanoveny pomocí ultrafialové viditelné absorpční spektroskopie při 260 nm.

B c) Konkordanční analýza

Všichni pacienti dostali transplantaci alogenních hematopoetických kmenových buněk ve smíšeném pohlaví a genotypizace se prováděla fluorescenční in situ hybridizací (FISH) pomocí soupravy CE-IVD CEP® X SpectrumOrange / Y SpectrumGreen™ přímo značené fluorescenční DNA sondy (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, DE). Analýza chimérismu na bázi PCR byla provedena s použitím Mentype® **DIPquant** (qPCR), Mentype® **DIPscreen** (Biotype GmbH), multiplexní PCR kombinované s kapilární elektroforézou genetický analyzátor ABI Prism® 3100 (Applied Biosystems, Carlsbad, US-CA); a Mentype® **Chimera**® (Biotype GmbH), multiplexní PCR kombinovaná s kapilární elektroforézou prováděnou s použitím genetického analyzátoru ABI Prism® 3100. Za použití soupravy Mentype® **DIPquant** bylo na reakci naneseno 250 ng DNA. Všechny soupravy byly použity podle pokynů výrobce.



Obrázek 3 Porovnání vzorků Mentype® DIPquant a Mentype® Chimera® při analýze chimerismu



Obrázek 4 Porovnání vzorků Mentype® DIPquant a Mentype® DIPscreen při analýze chimerismu

Koeficient stanovení (R^2) Mentype® **DIPquant** ve srovnání s FISH, Mentype® **Chimera**® a Mentype® **DIPscreen** byl 0,9648, 0,9849 a 0,9879. Nejlepší shody bylo dosaženo s Mentype® **DIPscreen**, který má stejné biomarkery: Nižší shoda s FISH odráží technické rozdíly. Podle pokynů výrobce by se mělo spočítat nejméně 200 buněk. Lepších výsledků se však dosáhne při počtech s více než 500 buňkami (Buño et al., 2005): Toho nebylo dosaženo u všech vzorků.

Vědecká platnost všech testovaných biomarkerů pro analýzu chiméry byla v literatuře široce uvedena (Thiede a kol. 2001, Thiede a Lion 2001, Wilhelm a kol. 2002, Buño a kol., 2005). Testy založené na PCR jsou již akceptovány v klinických pokynech (Bader et al., 2016). Nejprve byl použit FISH jako srovnávací test. Tato technika má stále lokální hodnotu v transplantacích, kde se pohlaví neshodují. U menší buněčné populace však vykazuje pouze citlivost 1 %. Multiplexní PCR založená na krátkých tandemových opakováních (STR), jako je Mentype® **Chimera**®, se často označuje jako zlatý standard analýzy chimérismu (Bader et al., 2016). Bialelické markery, jako jsou DIP, nabízejí technické výhody, jako jsou žádné kockavé píky při kapilární elektroforéze nebo jejich vhodnost pro qPCR, které mohou dosáhnout citlivosti menší než 0,1 % (Wilhelm et al., 2002; Bader et al., 2016).

B e) Reference

Bader P, Bornhäuser M, Grigoleit G-U, Kröger N für die DAG-KBT, Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e.V. Monitoring, Chimärismusanalysen und Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD). Allogene Stammzelltransplantation. Onkopedia Leitlinien. Stand Mai 2016. www.onkopedia.com.

Buño I, Nava P, Simón A, González-Rivera M, Jiménez JL, Balsalobre P, Serrano D, Carrión R, Gómez Pineda A, Díez-Martín JL. A comparison of fluorescent in situ hybridization and multiplex short tandem repeat polymerase chain reaction for quantifying chimerism after stem cell transplantation. *Haematologica*. 2005 Oct;90(10):1373-9. PubMed PMID: 16219574.

CLSI. Evaluation of detection capability for clinical measurement procedure; approved guideline, 2nd edition. CLSI document EP17-A2. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. ISBN 1-56238-796-0.

Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, Mohr B, Florek M, Kroschinsky F, Geissler G, Naumann R, Ritter M, Prange-Krex G, Lion T, Neubauer A, Ehninger G. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia*. 2001 Feb;15(2):293-302. PubMed PMID: 11236950.

Thiede C, Lion T. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Leukemia*. 2001 Feb;15(2):303-306. PubMed PMID: 11418870.

Wilhelm J, Reuter H, Tews B, Pingoud A, Hahn M. Detection and quantification of insertion/deletion variations by allele-specific real-time PCR: application for genotyping and chimerism analysis. *Biol Chem*. 2002 Sep;383(9):1423-33. PubMed PMID: 12437135

Biotype GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 Dresden

Tel. +49 351 8838 400

Fax +49 351 8838 403

support@biotype.de

www.biotype.de