

# Mentype<sup>®</sup> DIPquant

## Návod k použitiu

**Aplikácia qPCR pre alelovo špecifickú  
kvantifikáciu stavu chimérizmu**

Diagnostika in vitro



DIQIFU01v1sk

Jún 2021



45-015xx\*-0025

45-01591-0100



Biotype GmbH  
Moritzburger Weg 67  
D-01109 DRESDEN  
GERMANY

xx \* - definuje číslo položky špecifické pro lokus

Vyrobené v Nemecku

Biotype GmbH vyvíja, vyrába a distribuuje aplikácie založené na PCR pre lekársku diagnostiku.

Naše testovacie sady Mentype® zaručujú najvyššiu štandardu kvality.

Pre informácie a návrhy sme Vám radi k dispozícii. Kontaktujte nás alebo navštívte našu domovskú stránku [www.biotype.de](http://www.biotype.de).

## Obsah

<b>1. Použitie v súlade s určením .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Podkladové informácie.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Popis produktu Mentype® DIPquant .....</b>	<b>5</b>
3.1 Nástroj qPCR.....	6
3.2 Typ vzorkov.....	6
3.3 Senzitivita/špecifickosť .....	6
<b>3.3.1 Rozsah meranie chimérizmu.....</b>	<b>6</b>
<b>3.3.2 Citlivosť a špecifickosť.....</b>	<b>6</b>
<b>4. Výstrahy a bezpečnostné upozornenia .....</b>	<b>8</b>
4.1 Zaistenie kvality.....	8
<b>5. Materiály dodané spoločne zo sadou .....</b>	<b>9</b>
5.1 Obsah sady.....	9
5.2 Informácie pre objednanie.....	9
5.3 Požadované reagencie a vybavenie niesú súčasťou kitu.....	9
<b>6. Skladovanie .....</b>	<b>10</b>
<b>7. Pracovný postup .....</b>	<b>11</b>
7.1 Prehľad analýzy chimérizmu produkty Mentype®DIP.....	11
7.2 Príprava vzorkov a množstvo použité DNA .....	11
<b>7.2.1 Izolácia DNA .....</b>	<b>11</b>
<b>7.2.2 Templátová DNA .....</b>	<b>12</b>
7.3 Príprava master mixu.....	12
<b>7.3.1 Pozitívna kontrola .....</b>	<b>14</b>
<b>7.3.2 Negatívna kontrola .....</b>	<b>14</b>
7.4 Reakčný objem.....	15
<b>8. Program qPCR a amplifikácie .....</b>	<b>15</b>
8.1 Nastavenie prístroja a parametry amplifikácie .....	15
8.2 Parametry detekcie.....	15
8.3 Parametry amplifikácie qPCR* .....	15
<b>9. Doporučené nastavenie analýzy .....</b>	<b>16</b>
9.1 Kvantifikácie pred transplantáciou (pre-HSCT).....	16
9.2 Kvantifikácie po transplantácii / sledovanie (po HSCT) .....	17
<b>10. Vyhodnotenie .....</b>	<b>18</b>
10.1 Analýza dát .....	18
10.2 Kontrola výsledkov.....	18
<b>11. Kvantifikácia .....</b>	<b>19</b>
11.1 Kvantifikácia vzorkov pred HSCT.....	19
11.2 Kvantifikácia vzorkov po HSCT.....	19
<b>12. Interpretácia neobvyklých výsledkov .....</b>	<b>20</b>
12.1 Nízka sila signálu alebo bez detekovaného signálu.....	20

12.2 Kolísanie sily signálu v replikátoch .....	20
12.3 Signály testov špecifických pre recipienta v DNA dárcu .....	21
<b>13. Objednacie informácie.....</b>	<b>22</b>
<b>14. Referencie .....</b>	<b>24</b>
<b>15. Ochranné známky a vylúčenie zodpovednosti .....</b>	<b>25</b>
<b>16. Symboly.....</b>	<b>26</b>
<b>A Analytické údaje o výkone (overenie) .....</b>	<b>27</b>
A a) Ľudské DNA .....	27
A b) Analytická špecifickosť a Limit slepého pokusu (LoB) .....	27
A c) Analytická citlivosť a medze detekcie (LoD).....	27
A d) Merací rozsah testov.....	28
A e) Variácie medzi šaržami a testovanie parametrov testu v LoD .....	28
A f) Meranie v dvoch rôznych dňoch .....	29
A g) Stabilita po otvorení .....	29
<b>B Údaje o klinickom výkone.....</b>	<b>30</b>
B a) Etické a regulačné aspekty.....	30
B b) Preanalytika, izolácia DNA a kvantifikácia DNA .....	30
B c) Konkordančná analýza.....	30
B d) Výsledky a diskusia.....	31
B e) Referencie .....	33

# Mentype<sup>®</sup> DIPquant

## 1. Použitie v súlade s určením

Aplikácie Mentype<sup>®</sup> **DIPquant** sú založené na in vitro diagnostike založené na PCR (qPCR) v reálnom čase pre alelicky špecifickú a kvantitatívnu analýzu molekulárneho chimérizmu po alogennej transplantácii kostnej drene a krvných kmeňových buniek pomocou delece / inzercie polymorfismov (DIP, tiež označované ako INDELS, viz 14 Reference).

Aplikácie Mentype<sup>®</sup> **DIPquant** sú určené výhradne pre profesionálne použitie v špecializovaných laboratóriách. Personál by mal byť vyškolený v technikách qPCR a používaniu diagnostických zdravotníckych prostriedkov in vitro.

## 2. Podkladové informácie

Analýza molekulárneho chimérizmu po alogennej transplantácii kostnej drene a krvných kmeňových buniek je zásadné pre sledovanie rastu transplantátu alebo pre včasnú odhalenie hrozjacej odmietavej reakcie. Molekulárna chimérická analýza sa vykonáva pomocou detekcie individuálne špecifických polymorfismov delecí / inzerciou DNA, ktoré sú veľmi vhodné pre analýzu pomocou alelovo špecifických qPCR, v porovnaní s inými sekvenciami DNA.

V nadväznosti na identifikáciu informatívnych lokusov DIP pacienta a darcu pomocou CE-MD kitu Mentype<sup>®</sup> **DIPscreen**, možno so zodpovedajúcimi testami. Singleplex Mentype<sup>®</sup> **DIPquant** vykonať kvantitatívnu analýzu chimérizmom. Flexibilný formát testu umožňuje analýzu jednotlivých vzoriek i veľkých objemov vzoriek s minimálnymi nákladmi na materiál. Pretože je vysoká citlivosť qPCR spojená s obmedzenou presnosťou pri zmiešanom chimérizmom, odporúča sa pre vzorky zmiešaného chimérizmom analýza pomocou kitu Mentype<sup>®</sup> **DIPscreen** (smernica o alogennej transplantácii kmeňových buniek Nemeckej asociácie pre transplantáciu kostnej drene a krvi (DAG-KBT), Bader et al. 2016).

## 3. Popis produktu Mentype<sup>®</sup> DIPquant

Špecifické Singleplex testy Mentype<sup>®</sup> **DIPquant** možno použiť k individuálnej analýze 55 DIP alel a dvoch chromozomálnych oblastí spojených s Y (srov. Tabuľka 1). Referencie (REF) pre relatívnu kvantifikáciu je gen  $\beta$ -globinu. Parametry qPCR sú nastavené univerzálne, aby analýza rôznych testov Mentype<sup>®</sup> **DIPquant** špecifických pre príjemca a analýza viacerých vzorkov pacientov mohla byť vykonaná paralelne v jednom behu qPCR.

Chimérizmus sa počíta podľa  $\Delta\Delta$  metódy  $C_p$  [ $C_p$  (*crossing point*) prístroja Lightcycler<sup>®</sup> qPCR firmy Roche a odpovedá hodnote  $C_t$  (*cycle threshold*) iných prístrojov qPCR]. Pre relatívnu kvantifikáciu chimérizmu je preto potreba kvantifikácie **referenčného genu**  $\beta$ -globinu (*house-keeping*), ktoré prebieha paralelne s kvantifikáciou cieľového lokusu príjemca.

Pre kalibráciu analýzy musí byť analyzovaná recipientna DNA izolovaná pred transplantáciou (**Kalibrátor**), spoločne s referenčným testom ( $\beta$ -globin) a príslušným qPCR testom špecifickým pre príjemca (srov. Kapitola 9.1).

### 3.1 Nástroj qPCR

Testy Mentype® **DIPquant** boli overené a validované na prístroji real-time PCR Lightcycler® 480 II (Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, CH).

Používanie testov Mentype® **DIPquant** na iných prístrojoch qPCR musí užívateľ overiť a verifikovať.

### 3.2 Typ vzorkov

Mentype® **DIPquant** bol validovaný citrátovou DNA izolovanou z plnohodnotnej krvi.

Produkt Mentype® **DIPquant** je validovaný pre použitie 250 ng DNA na reakciu. Použitie väčších množstiev DNA musí byť užívateľom validované.

### 3.3 Senzitivita/špecifickosť

#### 3.3.1 Rozsah merania chimérizmu

Vďaka technologii je optimálny rozsah merania vzorkov chimérizmu pomocou testov Mentype® **DIPquant** qPCR medzi 0,05 % - 12,5 % meraného obsahu DNA príjemcu alebo dárca vo vzorku pacienta (zmiešaný vzorek). V tejto oblasti je možné použiť nastavenie qPCR, ako je popísané v kapitole 9.2. Pre vzorky s > 12,5 % meraného obsahu DNA príjemcu alebo dárca, ako aj pre zmiešané chimérické vzorky, sa doporučuje zvýšiť počet replikátov alebo použiť Mentype® **DIPscreen**.

#### 3.3.2 Citlivosť a špecifickosť

Detekčný limit a citlivosť kitu Mentype® **DIPquant** závisí na kvalite a množstve použitej templátovej DNA. Tabuľka 1 ukazuje citlivosť alelovo špecifických Mentype® **DIPquant** markerov v zmesiach DNA. Zmesi boli použité s množstvom 250 ng DNA; deficitné DNA boli homozygotné pre alelovo špecifický Mentype® **DIPquant** marker.

Maximálna hodnota C<sub>p</sub> uvedená v Tabuľka 1 udáva rozsah, do ktorého možno špecificky vyhodnotiť signály odpovedajúce testom Mentype® **DIPquant**.

**Tabuľka 1** Špecifické detekčné línie testov Mentype® DIPquant

Citlivosť a špecifickosť testov Mentype® DIPquant								
Bunečný ekvivalent DIP alely / PCR	5		10		20		80	
Koncentrácia [pg/PCR]	31,5	Hodnota max. Cp	63	Hodnota max. Cp	126	Hodnota max. Cp	500	Hodnota max. Cp
Podiel 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 bezpečnostné upozornenie

Berte prosím na vedomie bezpečnostné listy (MSDS) produktov Biotype®, ktoré Vám radi zašleme na požiadanie ([support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)). Ohľadne bezpečnostných listov reagencií, ktoré niesú súčasťou testovacej sady, sa obráťte na príslušného výrobcu.

Pred použitím produktu si pozorne prečítajte návod k použitiu.

Po dodaní zkontrolujte produkt a jeho komponenty, či sú úplné, pokiaľ ide o počet, typ a náplň (viz kapitola 5.1), správne označenie, štatút zmrazenia a neporušenosť balenia reagencií.

Pri použití testov noste rukavice, laboratórny plášť a prípadne ochranu očí.

Zabráňte kontaminácii vzorkov nukleázou (DNáza / RNáza) použitím jednorázových DNáza / RNáza – free, aerosol - nepriepustných pipetových špičiek s filterami.

Použite oddelené pracovné priestory pre prípravu vzorkov (pre-PCR), namiešanie mastermixu a následnú úpravu vzorkov a analýzu (post-PCR). Pozitívne kontroly skladujte v priestore oddelenom od ďalších komponentov kitu.

Podľa smerníc alebo požadavkov miestnych, štátnych alebo federálnych predpisov či akreditačných organizácií môžu byť potrebné dodatočné kontroly.

Nepoužívajte komponenty kitu, ktoré prekročili dátum expirácie a šarže nemiešajte.

Odpady zo vzorkov a testov likvidujte podľa miestnych bezpečnostných ustanovení.

#### **Platné do vrátane šarža DIP01113 (Reaction Mix D šarža CH1900491):**

V tejto súprave sú obsiahnuté následné potencionálne nebezpečné látky:

Zložka sady	Chemikálie	Nebezpečie
Reaction Mix D	Azid sodný NaN <sub>3</sub>	Toxický pri požití, pri kontakte s kyselinou tvorí toxické plyny

#### 4.1 Zaisťenie kvality

Celý obsah testovacej súpravy podlieha intenzívnej kontrole kvality spoločností Biotype GmbH. Kvalita testovacích súprav je priebežne preskúmaná, aby sa preukázala ich neobmedzená použiteľnosť. V prípade otázok na kontrolu kvality nás prosím kontaktujte na e-mailovú adresu [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de).



## 5. Materiály dodané spoločne so sadou

### 5.1 Obsah sady

Súpravy Mentype® **DIPquant** obsahujú nasledujúce zložky dostatočné k prevedeniu až 100 reakcií.

**Tabuľka 2** Velkosť balenia a obsiahnuté komponenty kitu Mentype® **DIPquant**, \* k dispozícii len ako referenčný test Mentype® **DIPquant**, # xxx definuje číslo položky špecifickej pre lokus

Názov	Obsah	Objem na veľkosť balenia	
		25 reakcií	100 reakcií*
Nuclease-Free Water	Voda neobsahujúca nukleázy	1,5 mL	2 x 1,5 mL
Reaction Mix D	Reakčná zmes D	125 µL	500 µL
<b>Mentype® DIPquant</b>			
-HLDxxx*-D/-I Primer Mix	Zmes primerov	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

Majte na myslí, že komponenty súpravy z rôznych šarží súpravy nesmie byť zmiešaný. Prehľad čísel šarží je uvedený na etikete, ktorá je umiestnená na vnútornej strane kľopy krabice. Rozdeľovanie komponentov súpravy do iných reakčných nádob nieje povolené.

### 5.2 Informácie pre objednanie

Písomnú objednávku prosím posielajte e-mailom na [sales@biotyper.de](mailto:sales@biotyper.de). Objedávka musí obsahovať objednacie čísla podľa Poznámka: Majte prosím na pamäti, že reakcie o veľkosti balenia 50 sa už nepredávajú.

**Tabuľka 3** a Tabuľka 13, strana 22.

**Poznámka:** Majte prosím na pamäti, že reakcie o veľkosti balenia 50 sa už nepredávajú.

**Tabuľka 3** Obecná forma objednávach čísel testov Mentype® **DIPquant**, \* xx definuje objednacie číslo testu Mentype® **DIPquant** špecifickeho pre lokus

Mentype® <b>DIPquant</b>	25 reakcií	Obj. č.	45-015xx* -0025 (*srov. Tabuľka 13)
Mentype® <b>DIPquant</b>	100 reakcií	Obj. č.	45-01591-0100
Reference			

### 5.3 Požadované reagensy a vybavenie nesú súčasťou obsahu kitu

Pre selekciu informatívnych dárcovských a podľa pacienta špecifických testov Mentype® **DIPquant** v multiplexnej PCR je k dispozícii nasledujúci kit:

**Tabuľka 4** Informácie pre objednanie kitu Mentype® **DIPscreen**, \* yyy definuje veľkosť balenia

Reagent	Dodavateľ	Objednacie číslo
Mentype® <b>DIPscreen</b> (určovanie genotypu)	Biotype GmbH	45-45410-0yyy*

**Upozornenie:** Miesta nasadenia primerov u kitu Mentype® **DIPquant** sa líšia od miest nasadenia primerov v kitu Mentype® **DIPscreen**. Vo vzácnych prípadoch môžu mutácie, ktoré sa vyskytujú v miestach nasadenia primerov, spôsobiť alelické výpadky (*allelic dropouts*). Z tohoto dôvodu môžu medzi testami Mentype® **DIPquant** a Mentype® **DIPscreen** nastať genotypové rozdiely. Výsledky Mentype® **DIPscreen** by preto mali byť vždy verifikované predom vybranými informatívnymi testami Mentype® **DIPquant** overené pred tým, než sa použijú pri monitorovaní chimérizmu (viz tiež kapitola 9.1).

Pre amplifikáciu qPCR sú vyžadované nasledujúce reagenty a prístroje:

- Vhodný prístroj real-time PCR (viz kapitola 3.1)
- Vhodná súprava pre izoláciu DNA (srov. Kapitola 7.2.1)
- Vhodný nástroj pre kvantitatívne meranie koncentrácie DNA po izolácii a čistení (srov. kapitola 7.2.1)
- Stolná centrifúga s rotorom pre 2 mL reakčnej skúmavky
- Mikrotitračné doštičky s 96 jamkami alebo reakčné skúmavky, v prípade použitia mikrotitračných doštičiek s 96 jamkami vhodné uzávery alebo fólie, centrifúga s rotorom na mikrotitračné doštičky
- Vortex, vhodný pre mikrotitračné doštičky s 96 jamkami alebo pre 0,2 mL reakčné skúmavky
- pipety, pipetové špičky s filtrami (jednorázové)
- jednorázové rukavice bez pudru

**Upozornenie:** Zaisťte, aby boli všetky prístroje instalované, udržiavané a kalibrované podľa podmienok výrobcu. Uistite sa, že sú prítomné všetky reagenty pre ovládanie príslušného prístroja qPCR (viz návod k použitiu od príslušného výrobcu nástroja).

## 6. Skladovanie

Testy Mentype® **DIPquant** sa dodávajú na suchom ľade. Zložky testov budú doručené zmrazené. Ak by jedna alebo viaceré zložky neboli po obdržaní zmrazené, alebo ak by došlo k poškodeniu zkúmviek počas prepravy, obráťte sa pre ďalšiu podporu na spoločnosť Biotype GmbH ([support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)).

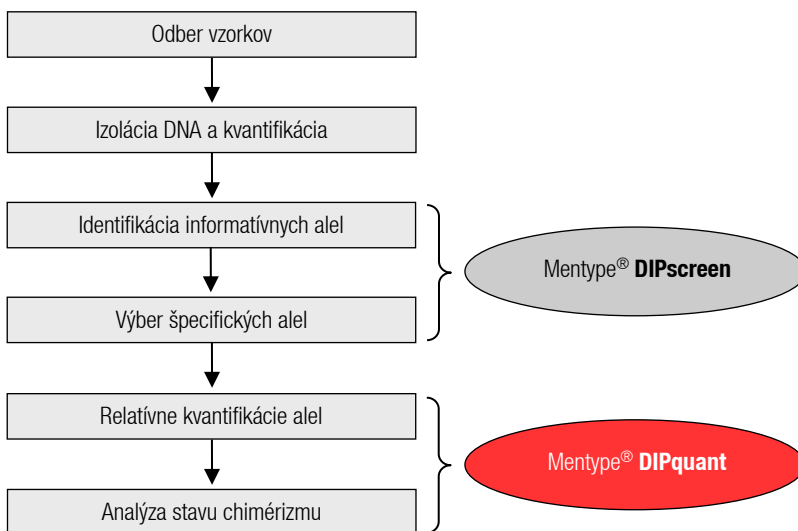
Komponenty musia byť skladované pri  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zabráňte opakovanému rozmrazeniu a zmrazeniu. Maximálny počet 8 cyklov rozmrazenia a zmrazenia nesmie byť prekročený.

Súpravy Mentype® **DIPquant** by mali byť skladované chránené pred svetlom.

Trvanlivosť zkušobnej súpravy je uvedená na etikete obalu.

## 7. Pracovný postup

### 7.1 Prehľad analýzy chimérizmu produkty Mentype®DIP



**Obrázok 1** Od vzorkovania po analýzu - analýza chimérizmu pomocou Mentype® DIPscreen a Mentype® DIPquant

### 7.2 Príprava vzorkov a množstvo použitej DNA

#### 7.2.1 Izolácia DNA

Kvalita izolovanej DNA má rozhodujúci vplyv na parametre a kvalitu celého testovacieho systému. Musí byť zaistené, že systém používaný pre izoláciu DNA je kompatibilný s technológiou qPCR.

Pre izoláciu DNA sú vhodné nasledujúce kity:

- NucleoSpin® Blood L (Macherey Nagel GmbH, Düren, DE)
- QIAamp® DNA Blood Midi Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE)

Pre izoláciu DNA môžu byť použité tiež alternatívne kity, ale ich vhodnosť musí byť overená užívateľom.

**Upozornenie:** Pre získanie presných výsledkov je nutná kvantifikácia DNA (napr. UV / VIS spektroskopickou kvantifikáciou DNA pri A260 nm a stanovení kvality pomocou pomeru A260 / A280, ktorý by mal byť medzi 1,7 a 2,0).

### 7.2.2 Templátová DNA

Alelicky špecifická zmes primerov je optimalizovaná pre použitie 250 ng purifikovanej DNA, čo odpovedá použitiu 41 666 buniek (6 pg DNA / bunka). Pre optimálne výsledky sa doporučuje použiť 250 ng DNA.

### 7.3 Príprava master mixu

Všetky reagenty by mali byť pred pridaním do mastermixu dobre premiešané (vortexované) a krátko centrifugované (cca 10 s).

Množstvo použitej DNA závisí na jej koncentrácii. Pre dosiahnutie optimálnych výsledkov doporučujeme kvantitu pridanej DNA upraviť na 250 ng DNA na reakciu.

Celkový objem PCR reakcie by mal byť vždy 25 µL.

Zvážte pozitívne a negatívne kontroly pre počet reakcií qPCR, ktoré majú byť použité v analýze. Pridajte k celkovému objemu jednu alebo dve reakcie pre kompenzáciu chýb pipetovania.

Nasledujúca tabuľka ukazuje objemy jednotlivých reagentov kitu pri použití s 5,0 µL vzorku (templátové DNA) a v reakčnom objeme 25 µL.

**Tabuľka 5** Zloženie Mastermixu pre reakciu Mentype® DIPquant pri 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
<b>Celkový objem mastermixu</b>	<b>20,0 µL</b>
Templát DNA (50 ng/µL)	5,0 µL

\* obsahuje  $Mg^{2+}$ , dNTPs, BSA

**Upozornenie:** DNA ried'te a uchovávajte v 1 x TE (10 mM Tris HCl, pH 8,0 a 1 mM EDTA) alebo 0,1 x TE alebo vo vode neobsahujúcej nukleázy.

### 7.3.1 Pozitívna kontrola

Pre pozitívnu kontrolu použite miesto templátovej DNA 5 µL otypované, alelovo špecifické kontrolné DNA (5 ng/µL). Pipetujte kontrolnú DNA namiesto templátovej DNA do skúmaviek obsahujúcich mastermix qPCR.

Nasledujúci prehľad ukazuje objemy zložiek súpravy použité s 5,0 µL kontrolnej DNA a reakčný objem 25 µL.

**Tabuľka 6** Zloženie Mastermixu pre reakciu Mentype® **DIPquant** pri použití 5 ng/µL vzorku pozitívnej kontroly

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

\* obsahuje Mg<sup>2+</sup>, dNTPs, BSA

### 7.3.2 Negatívna kontrola

Ako negatívnu kontrolu napipetujte 5 µL vody bez nukleázy miesto templátovej DNA do skúmaviek obsahujúcich mastermix qPCR.

Nasledujúca tabuľka znázorňuje objemy komponentov kitu pri použití 5,0 µL vody (nuclease-free), v reakčnom objeme 25 µL.

**Tabuľka 7** Zloženie Mastermixu pre reakciu Mentype® **DIPquant** pri použití 5 µL negatívnej kontroly (vody)

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

\* obsahuje Mg<sup>2+</sup>, dNTPs, BSA

## 7.4 Reakčný objem

Pipetujte 20 µL reakčné zmesi qPCR do skúmaviek (optické doštičky) alebo do viacjamkovej doštičky (optické viacjamky). Potom pridajte 5 µL špecifickej DNA (viz schéma pipetovania v kapitolách 9.1 a 9.2) alebo 5 µL pozitívnej alebo negatívnej kontroly.

Pokiaľ je to možné, pre prístroj qPCR by mali byť použité biele doštičky alebo skúmavky, pretože to zaisťujú účinnú detekciu fluorescenčných signálov. Optimalizovaná detekcia fluorescence môže zvýšiť citlivosť testu.

Po pipetovaní by mali byť skúmavky alebo viacjamkové doštičky spoľahlivo uzavreté (optické uzávery, optické tesnenie).

Krátko odstred'te a potom vložte do prístroja pre analýzu.

## 8. Program qPCR a amplifikácia

### 8.1 Nastavenie prístroja a parametry amplifikácie

Pomocou nižšie uvedených parametrov vytvorte protokol pre amplifikáciu a detekciu qPCR. Nastavenie pre konkrétny prístroj nájdete v príručke príslušného výrobcu prístroja alebo sa obráťte na našu technickú podporu ([support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)).

### 8.2 Parametry detekcie

6-FAM slúžia ako referenčné fluorescenčné farbivo pre všetky testy. Venujte pozornosť výberu správnej sady filtrov v softvare prístroja real-time PCR.

### 8.3 Parametry amplifikácie qPCR\*

Multi Taq2 polymeráza je pri nižšej teplote reverzibilne inaktívna, čo slúži k potlačeniu tvorby nešpecifických amplifikačných produktov. Pre aktiváciu enzýmu by mal byť vykonaný „hot start“.

**Tabuľka 8** qPCR Amplifikačné parametry pre vykonávanie testov Mentype® DIPquant

Teplota	Čas	
94 °C	4 min (hot start pre aktiváciu Multi Taq 2 DNA polymerázy)	
94 °C	30 s	45 cyklů
<b>62 °C</b>	<b>45 s</b>	

\* Validované pomocou Roche Light Cycler® LC480 (s štandardnými rýchlosťami zahrievania približne 4,4 °C/s a rýchlosťou chladenia 2,2 °C/s).

K zberu dát by malo dôjsť behom fáze annealingu primerov a behom elongacie pri 62 °C. Vytvorte protokol testovania vzorkov s príslušným nastavením analýzy.

## 9. Doporučené nastavenie analýzy

Za účelom riešenia optimálneho meracieho rozsahu qPCR by mal byť zmeraný podiel recipienta v zmiešanom vzorku (viz kapitola 3.3.1)

Pre relatívnu kvantifikáciu chimérizmu sa doporučuje príprava testov qPCR podľa nasledujúceho schématu:

- **3 rôzne alely špecifické pre recipienta** („allele of interest“, AOI) v **duplikátoch** (viz Tabuľka 9, Tabuľka 12, Tabuľka 13), **alebo**
- **2 rôzne alely špecifické pre recipienta** („allele of interest“, AOI) v **triplikátoch** (viz Tabuľka 10)
- Podľa DNA a času, musia byť **aktívne referencie** (REF,  $\beta$ -globin) merané aspoň v **duplikátoch** (lepšie v triplikátoch)
- **negatívne (NTC)** a **pozitívna kontrola (PC)** by mala byť súčasťou každého testovania

**Tabuľka 9** Nastavenie 1: Použitie 3 špecifických Mentype® **DIPquant** v duplikátoch a Mentype® **DIPquant** referenčného testu v triplikátoch

Test	Replikácie	Počet vyšetrovaných lokusov
Špecifické testy DIPquant	2	3
Referenčný test ( $\beta$ -globin)	3	-

**Tabuľka 10** Nastavenie 2: Použitie 2 špecifických Mentype® **DIPquant** v triplikátoch trojitým vyhotovením a Mentype® **DIPquant** referenčného testu v triplikátoch

Test	Replikácie	Počet vyšetrovaných lokusov
Špecifické testy DIPquant	3	2
Referenčný test ( $\beta$ -globin)	3	-

### 9.1 Kvantifikácie pred transplantáciou (pre-HSCT)

DNA recipienta pred transplantáciou (kalibrátor pre-HSCT) by mala byť analyzovaná spoločne s referenčným testom ( $\beta$ -globinový gen) a príslušnými qPCR testami špecifickými pre recipienta pre kalibráciu analýzy. Hodnota tejto kvantifikácie je stanovená ako 100 % podielu recipienta.



Pre zaistenie špecifičnosti qPCR testov špecifických pre recipienta by mala byť urobená analýza DNA dárca. To odpovedá 0 % podielu recipienta.

**Tabuľka 11** Príklad nastavenia viacjamkovej doštičky pred transplantáciou (kalibrátor)

	1	2	3	4
<b>A</b>	Ref preTx	AOI-1 preTx	AOI-2 preTx	AOI-3 preTx
<b>B</b>	Ref preTx	AOI-1 preTx	AOI-2 preTx	AOI-3 preTx
<b>C</b>	Ref NTC	AOI-1 NTC	AOI-2 NTC	AOI-3 NTC
<b>D</b>	Ref PC	AOI-1 PC	AOI-2 PC	AOI-3 PC
<b>E</b>		AOI-1 Dárce*	AOI-2 Dárce*	AOI-3 Dárce*
<b>F</b>		AOI-1 Darca*	AOI-2 Darca*	AOI-3 Darca*

Ref: Referenčný test; AOI 1-3: Test špecifický pre recipienta; preTx: Vzorek recipienta ako kalibrátor; Darca \*: Voliteľný vzorek darcu ako test špecifickosti; NTC: Žiadna kontrola šablón; PC: Pozitívna kontrola

## 9.2 Kvantifikácia po transplantácii / sledovanie (po HSCT)

Chimérické monitorovanie by malo byť vykonávané s DNA pacienta, ktorá bola čerstvo izolovaná v príslušných časoch monitorovania. Pre bezpečnú analýzu by mala byť zahrnutá referencia, tri alely špecifické pre recipienta, ako aj pozitívne a negatívne kontroly (viz nižšie).

**Tabuľka 12** Príklad nastavenia viacjamkovej doštičky po transplantácii (sledovania)

	1	2	3	4
<b>A</b>	Ref Monitorovanie 1	AOI-1 Monitorovanie 1	AOI-2 Monitorovanie 1	AOI-3 Monitorovanie 1
<b>B</b>	Ref Monitorovanie 1	AOI-1 Monitorovanie 1	AOI-2 Monitorovanie 1	AOI-3 Monitorovanie 1
<b>C</b>	Ref NTC	AOI-1 NTC	AOI-2 NTC	AOI-3 NTC
<b>D</b>	Ref PC	AOI-1 PC	AOI-2 PC	AOI-3 PC

Ref: Referenčný test; AOI 1-3: Testy špecifické pre recipienta; Sledovanie 1: Prvý monitorovací vzorek po transplantácii; NTC: Žiadna kontrola šablón; PC: Pozitívna kontrola;

## 10. Vyhodnotenie

### 10.1 Analýza dát

Pozrite amplifikačné krivky celého behu qPCR. Podrobný proces analýzy nezpracovaných dát závisí na použítom prístroji real time PCR.

Definícia prahovej hodnoty „baseline noise levels“ by mala byť stanovená automaticky, alebo by mala byť predefinovaná pre špecifické cykly (napr. 3-15). K určeniu prahovej hodnoty použijete **NTC**.

Pretože sa pre kvantifikáciu používa metóda  $\Delta\Delta C_p$ , nemajú individuálne nastavené hodnoty thresholdu žiadny vplyv na výsledky, pokiaľ sú analyzované všetky testy na vzorku so rovnakým thresholdom.

Informácie o exportu a spracovaní dát nájdete v príručke výrobcu zariadenia real-time PCR. Exportujte názov vzorku „Názov vzorku“ a hodnoty  $C_p$  pre následné výpočty.

### 10.2 Kontrola výsledkov

QPCR bola úspešná, keď sú hodnoty  $C_p$  pozitívnej kontroly vyhodnotiteľné podľa hodnôt v Tabuľka 1 a negatívna kontrola je bez amplifikácie < 45 cyklov.

Pomocou donorovej DNA pre kontrolu špecifčnosti testu by nemali byť detekovateľné žiadne signály s hodnotami  $C_p$  nižšími než je znázornené v Tabuľka 1.

## 11. Kvantifikácie

Ak údaje vyhodnocujete ručne, použite metódu relatívnej kvantifikácie. Individuálne nastavené prahové hodnoty (threshold) počas analýzy prvotných dát nemajú žiadny vplyv na kvantifikáciu metódou  $\Delta\Delta C_p$ , pokiaľ sú analyzované všetky testy na vzorku so stejným thresholdom.

Pomocou **NTC** vyhľadajte vhodný threshold.

### Výpočet

#### 11.1 Kvantifikácie vzorkov pred HSCT

1. Vypočítajte jednotlivé hodnoty  $C_p$  pre referenčné (REF) a cieľovo sledované alely (AOI) pre DNA recipienta
2. Vypočítajte  $\Delta C_p$  pre každý AOI pre REF ( $\Delta C_p C = C_p AOI - C_p REF$ )
3.  $\Delta C_p$  vráti hodnotu kalibrátoru ( $\Delta C_p C$ ) vo výpočte po HSCT (100% príjemca)

#### 11.2 Kvantifikácie vzorkov po HSCT

1. Vypočítajte jednotlivé hodnoty  $C_p$  pre referenčné (REF) a cieľovo sledované alely (AOI) pre DNA pacienta
2. Vypočítajte  $\Delta C_p$  pre každý AOI pre REF ( $\Delta C_p C = C_p AOI - C_p REF$ )
3. Táto  $\Delta C_p$  hodnota sa používa pre výpočet neznámeho stavu ( $\Delta C_p U$ )
4. Vypočítajte  $\Delta\Delta C_p$  pre kvantifikáciu chimérizmu ( $\Delta\Delta C_p = \Delta C_p U - \Delta C_p C$ )
5. Vypočítajte % zložky recipienta v závislosti na účinnosti qPCR; % recipienta =  $((1 + E)^{-\Delta\Delta C_p}) \times 100$ . Pokiaľ je účinnosť qPCR 100 %, použite nasledujúci vzorec:  $(2^{-\Delta\Delta C_p}) \times 100$ .

## 12. Interpretácia neobvyklých výsledkov

### 12.1 Nízka sila signálu alebo bez detekovaného signálu

Do reakčnej zmesi nebola pridaná jedna alebo viac zložiek: Skontrolujte amplifikáciu pozitívnej kontroly a v prípade potreby opakujte qPCR.

Pre analýzu bol použitý nesprávny test: Uistite sa, že alelovo-špecifické testy sú kompatibilné s testami, špecifickými pre príjemcu.

Suboptimálne podmienky qPCR: Skontrolujte nastavenie qPCR. Zaisťte, aby prebehla aktivácia Multi Taq2 DNA polymerázy pri 94 °C po dobu 4 min. Skontrolujte teplotu annealingu a elongácie. Uistite sa, že rýchlosť ohrevu prístroja je nastavená na 4 °C/s a rýchlosť ochladzovania prístroja je nastavená na 2 °C/s.

QPCR bola inhibovaná: Po extrakcii DNA neboli inhibitory PCR úplne odstránené. Nezabudnite preto DNA dôkladne purifikovať podľa pokynov výrobcu súpravy. Purifikujte DNA znovu alebo zried'te vzorek. Opakujte qPCR s purifikovanou alebo zriedenou DNA.

Získanie dát sa nepodarilo: Uistite sa, že zber fluorescenčných dát bol vykonaný v správnom fluorescenčnom kanále v správny čas. Skontrolujte nastavenie prístroja na fluorescenčnú farbu použitú v teste (6-FAM a ROX).

Problémy s baseline, alebo s thresholdom: Nastavte threshold nad nespecifickým pozadím, aby ste získali presné hodnoty Cp. Použite postup uvedený v príručke od výrobcu prístroja qPCR. Pokiaľ je to možné, ručne upravte nastavenie baseline a thresholdu.

Degradácia templátovej DNA: Počas prípravy vzorku a behom skladovania môže dôjsť k degradácii DNA. DNA skladujte v 1 x alebo 0,1 x TE alebo vo vode (nuclease-free). Použite kontrolné DNA ku kontrole celkového chovania testu.

Degradácia komponentov qPCR: Skontrolujte expiráciu použitých reagensí a podmienky ich skladovania. Vyvarujte sa častému zamrazovaniu a rozmrazovaniu zmesi primerov > 8 cyklov a uistite sa, že zložky sú skladované pri -25 °C až -15 °C.

### 12.2 Kolísanie sily signálu v replikátoch

Chyba pipetovania: Chybe pipetovania sa vyhnete pravidelnou kontrolou pipetovej sady.

Variácie v Master Mixu: Pri pridávaní reakčnej zmesi pridajte 1-2 ďalšia reakcia navyš, aby ste nahradili nepresnosti pipetovania. Komponenty dôkladne premiešajte krátkym vortexovaním a krátkym odstred'ovaním (10 s). Pipetujte najmenej 5 µL templátové DNA.

qPCR bola inhibovaná: Behom izolácie DNA neboli inhibitory PCR úplne odstránené. Preto se uistite, že izolácia DNA je vykonávaná pečlivo podľa pokynov výrobcu. Purifikujte DNA znovu alebo ju zried'te. Opakujte qPCR s purifikovanou / zriedenou DNA.

Baseline alebo threshold boli nastavené nesprávne: Ak chcete získať presné hodnoty Cp, nastavte threshold nad nešpecifickým pozadím. Použite postup popísaný v príručke výrobcu vášho prístroja qPCR. Pokiaľ je to možné, ručne upravte nastavenie baseline a threshold.

Nízka citlivosť: Použitie príliš malého množstva DNA (optimálne 250 ng) môže znížiť citlivosť a reprodukovateľnosť v replikátach. Kvantifikujte použitú DNA a merajte jej kvalitu odpovedajúcimi metódami podľa doporučenia v kapitole 7.2.1.

Signály v negatívnej kontrole: Aby ste predišli kontaminácii, použite špičky s filtrami ktoré sú nepriepustné pre aerosoly. Spustíte novú qPCR s nuclease-free vodou. Reagencie pred a po PCR skladujte oddelene. Pokiaľ je to možné, pipetujte reakčnú zmes a DNA v rôznych miestnostiach.

### **12.3 Signály testov špecifických pre recipienta v DNA darcu**

Použitie príliš veľkého množstva (> 250 ng) templátovej DNA: Znížte množstvo templátovej DNA na 250 ng. Pred testovaním musí byť stanovená koncentrácia DNA.

Výskyt falošne negatívnych signálov: Vo vzácnych prípadoch môže mutácia vyskytujúca sa v miestach nasedania primeru viesť k alelickým „výpadkom“. Genotypizácia pomocou Mentype® **DIPscreen** môže viesť k falošne negatívnym výsledkom (viz kapitola 5.3, 9.1). Pretože miesta nasadenia primerov v testoch Mentype® **DIPquant** se líši od miest v testoch Mentype® **DIPscreen**, môže byť qPCR stále pozitívny. To musí byť ovšem overené pri monitoringu chimérizmu pred aplikáciou alelovo-špecifickej analýzy DIPquant.

### 13. Objednacie informácie

**Tabuľka 13** Podrobné objednacie informácie pre alelovo-špecifické testy Mentype® **DIPquant**, \* k dispozícii tiež vo veľkosti balenia 100 reakcií (45-01591-0100)

Test DIPquant	25 reakcií
Referencie*	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](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, Ellard 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 vylúčenie zodpovednosti

Registrované názvy, značky atd., použité v tomto dokumente, nieje možné považovať za nechránené, aj keď nie sú ako registrované výslovne označené: Biotype<sup>®</sup>, Mentype<sup>®</sup> (Biotype GmbH); LightCycler<sup>®</sup> (Roche Diagnostics International AG); QIAamp<sup>®</sup> (QIAGEN GmbH); NucleoSpin<sup>®</sup> (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG); FAM<sup>™</sup>, ROX<sup>™</sup> (Life Technologies Ltd.).

Testy Mentype<sup>®</sup> **DIPscreen** a Mentype<sup>®</sup> **DIPquant** sú súpravy označené značkou CE podľa európskej smernice in vitro 98/79 / ES. Sady nie sú dostupné ako diagnostika in vitro mimo túto regulačnú oblasť.

## 16. Symboly



**Výrobca**



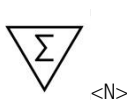
**Odkaz na eIFU**



**Objednacie číslo**



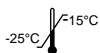
**Diagnostika in vitro**



**Dostatočné pre testy <N>**



**Možno použiť do**



**Obmedzenie teploty**



**Udržujte v suchu**



**Chrňte pred svetlom**



**Označenie šarže**

## Overenie a validácia amplifikačných kitov qPCR Mentype® DIPquant

### A Analytické údaje o výkone (overenie)

#### A a) Ľudská DNA

Pre všetky overovacie experimenty bola použitá biobanka z viac než 100 vzorkov ľudskej DNA pripravených zo žilnej krvi ETDA. Vzorky pochádzali od nepríbuzných zdravých dobrovoľníkov, ktorí dali svoj písomný súhlas. Preamalytika, izolácie DNA a kvantifikácie DNA viz kapitola B b).

#### A b) Analytická špecifičnosť a Limit slepého pokusu (LoB)

**Cieľ:** Produkt pozostáva z 57 testov na autozomálne bialelické markery, dvoch Y chromozomálnych markerov a referenčného genu. Špecifičnosť alelických a Y chromozomálne špecifických testov Mentype® DIPquant musí byť zaistená v prítomnosti prebytku alternatívnej alely alebo chromozómu X definovaného produktom.

**Metodika:** Pre každý test Mentype® DIPquant boli zhromaždené data qPCR z kontrol bez templátu (NTC,  $n \geq 12$ ) a z kontrol s 250 ng homozygotnej DNA pre alternatívnu alelu, alebo data z qPCR pri použití 250 ng ženskej DNA (v prípade markerov špecifických pre Y) ( $n \geq 9$ ). Tieto qPCR data by nemali byť detekované.

**Výsledky:** U všetkých NTC neboli zaznamenané falošne pozitívne signály pred 45 cyklami. V prípade 250 ng homogennej DNA pre alternatívnu alelu alebo samičiou DNA, testy Mentype® DIPquant qPCR nepreukázali žiadne signály pred 45 cyklom. Ďalšie testy ukázali nešpecifické signály pred 45 cyklom. Pri 9 paralelných meraniach však bolo pozorované stochastické rozdelenie medzi 1 a 6 falošne pozitívnych výsledkov. Preto bol pre výpočet LoB použitý neparametrický analytický prístup (CSLI 2012, data neuvedené).

#### A c) Analytická citlivosť a medza detekcie (LoD)

**Cieľ:** Boli vykonané experimenty k určeniu analytického detekčného limitu (LoD) všetkých testov qPCR.

**Metodika:** Výpočet, či LoD spĺňa kritérium kvality pre vylúčenie falošne pozitívnych výsledkov, bol vypočítaný pomocou rovnice  $\text{LoB} - (\text{LoD} + 2 \times \delta) \geq 2$ , kde LoB je hodnota  $C_p$  stanovená podľa A a) sa stanoví neparametricky; LoD je stredná hodnota  $C_p$  pozitívnych meraní; a 5 je štandardná odchýlka LoD. Zmesi DNA boli vytvorené pre všetky alelovo špecifické testy s použitím 250 ng homozygotnej DNA pre alternatívnu alelu alebo 250 ng ženskej DNA (v prípade markerov špecifických pre Y) na PCR reakciu a rôzne množstvo homozygotnej DNA alely, ktorá má byť detekovaná. Počet opakovaní bol 6 (3 v dvoch rôznych dňoch).

**Výsledky:** Najskôr sa pridalo 31,5 pg DNA cieľovej alely, ktorá sa má detekovať (čo odpovedá 0,01 % podielu alely). Ďalšie experimenty s 63 pg (0,025 % podiel alely), 126 pg (0,05 % podiel alely) a 500 pg, v tomto poradí (0,2 % podiel alely) boli vykonané v prípadoch, kedy nebolo splnené kritérium prijateľnosti kvality. Výsledky všetkých testov qPCR sú uvedené v tabuľke 1.

#### A d) Merací rozsah testov

**Cieľ:** Bol stanovený lineárny rozsah testov.

**Metodika:** Experimenty zahrňovali všetky data z A b) a A c). Okrem toho bola merané sériové riedenia rekombinantných plasmidov kódujúcich DNA oblasti alel, ktoré majú byť detekované, v rozmedzí 5 až 5 120 kópií na reakciu. Bolo vykonané celkom 11 riedení včetně kontrol bez templátu (NTC) a počet replikátov bol 6 (3 v dvoch rôznych dňoch).

výsledky: Pre všetky testy bol definovaný rozsah lineárneho merania  $24 \leq C_p \leq LOD$ . Hodnota  $C_p$  24 s 5 120 kópiami cieľovej alely odpovedá 12,5 % deficitnej DNA v zmesi s celkom 250 ng DNA na reakciu.

#### A e) Variácie medzi šaržami a testovanie parametrov testu v LoD

**Cieľ:** Koncentračné pomery zložiek PCR pufru Reaction Mix D polymerázy Multi Taq 2 sú kritické pre citlivosť, špecifickosť a rovnováhu signálov v qPCR. Bol testovaný vplyv variácií (rôzne šarže) na vyššie uvedené komponenty kitu.

**Metodika:** Boli testované štyri šarže reakčnej zmesi D a tri 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 boli riadne použité pre meranie. QPCR bola amplifikovaná za štandardných podmienok s kontrolnou DNA (General Positive Control, Biotype GmbH) v dvoch rôznych koncentráciách DNA (50 pg na PCR reakciu a 5 ng na PCR reakciu). Pre každú koncentráciu boli vykonané tri paralelné vzorky. Okrem toho boli vykonané tri qPCR s NTC na každý test **DIPquant** a na každú šaržu.

**Výsledky:** Výsledky sú uvedené v Tabuľka 14 a Tabuľka 15.

**Tabuľka 14** Rozdiel medzi štyrmi šaržami reakčnej zmesi D

Test Mentype® <b>DIPquant</b>	5 ng templátovej DNA		50 pg templátovej DNA	
	Stredný cp	$\delta$	Stredný cp	$\delta$
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
---------	-------	------	-------	------

**Tabuľka 15** Variácie medzi tromi šaržami DNA polymerázy Multi Taq 2

Test Mentype® <b>DIPquant</b>	5 ng templátovej DNA		50 pg templátovej DNA	
	Stredný cp	$\delta$	Stredný cp	$\delta$
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) Meranie v dvoch rôznych dňoch

**Cieľ:** Merania boli vykonané v dvoch samostatných dňoch, aby sa demonštroval účinok pipetovania dvoch nezávislých hlavných zmesí a prístroja na vykonanie testu.

**Metodika:** Pre simuláciu potenciálnych chýb pipetovania užívateľom bolo  $\pm 10\%$  objemových výkyvov PCR pufu a Multi Taq 2 porovnané so štandardnou odpoveďou v 3 vysoko výkonných a 3 nízko výkonných qPCR testoch. QPCR bol testovaný za štandardných podmienok s kontrolnou DNA (obecná pozitívna kontrola) s 2 rôznymi koncentraciami DNA (50 pg na PCR reakciu a 5 ng na PCR reakciu). Pre každú koncentráciu boli vykonané tri paralelné vzorky. Okrem toho boli stanovené tri slepé hodnoty (NTC) na test DIPquant a na šaržu.

**Výsledky:** Možné chyby pipetovania s fluktuáciou objemu  $\pm 10\%$  neovlivňujú výkon zvolených testov Mentype® **DIPquant** s 5 ng GPC. Kritérium prijateľnosti je dosiahnuté pre všetky testy a pre každú simulovanú pipetovacia chybu. Niesú žiadne chyby a neboli zistené žiadne nešpecifické vedľajšie produkty.

Použitím 50 pg GPC na reakciu sú možné širšie variácie  $> 2$  Cp. Preto je používanie kalibrovaných zariadení, ako sú pipety, povinné.

#### A g) Stabilita po otvorení

**Cieľ:** Stabilita reagencií súpravy qPCR bola testovaná po opakovanom zmrazení a rozmrazení. Toto napodobuje skutočné bežné používanie produktu v simulovanom (zrychlenom) procese.

**Metodika:** Ako príklad boli vybrané štyri testy Mentype® **DIPquant**. Zmesi primerov a sond boli podrobené 8 násobnému cyklu zmrazení a rozmrazení. Zmrazenie bolo vykonané po dobu aspoň 30 minút pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Rozmražené boli pri teplote miestnosti a reagencie boli pred použitím homogenizované pretrepaním. Následne bola vykonaná štandardná reakcia. Aby sa zabránilo ďalšiemu vplyvu použitím rôznych DNA, bola ako templát použitá kontrolná DNA

(GPC). Pre test boli zvolené dve rôzne koncentrácie DNA (50 pg na PCR reakciu a 5 ng na PCR reakciu). Pre každú koncentráciu boli vykonané tri opakované vzorky. Okrem toho boli do každého testu Mentype® **DIPquant** zahrnuté tri NTC.

**Výsledky:** Časté zmrazenie a rozmrazenie nemá žiadny negatívny dopad na vykonávanie testov DIPquant. Detekcia pomocou zmesi primer-sonda je tiež možná po 8 násobnom zmrazení a rozmrazení. Hodnoty C<sub>p</sub> sa menia minimálne. Odchyľka je v rozsahu variability cykléru qPCR.

## **B Údaje o klinickom výkone**

### **B a) Etické a regulačné aspekty**

Test hodnotenia výkonnosti bol vykonaný v súlade s článkom §§ 20 - 24 Zákona o lekárskech produktoch (DE). Oslobodenie od schvalovacej povinnosti pre lekárske výrobky s nízkym bezpečnostným rizikom podľa § 7 nariadenia o klinických skúškach lekárske výrobkov bolo udelené Spolkovým ústavom pre liečivá a lekárske výrobky. Protokol bol schválený miestnou etickou komisiou centra klinického hodnotenia. Všetci účastníci boli dospelí, sui juris a dali svoj písomný súhlas.

### **B b) Preanalytika, izolácia DNA a kvantifikácia DNA**

Boli použité žilné vzorky krvi ETDA (napr. S-Monovette K2E, Sarstedt AG & Co. KG, Nuembrecht, DE). Izolácia DNA z plnohodnotnej krvi bola vykonaná pomocou súpravy QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE) podľa pokynov výrobcu. Koncentrácie DNA boli stanovené pomocou ultrafialovej viditeľnej absorpčnej spektroskopie pri 260 nm.

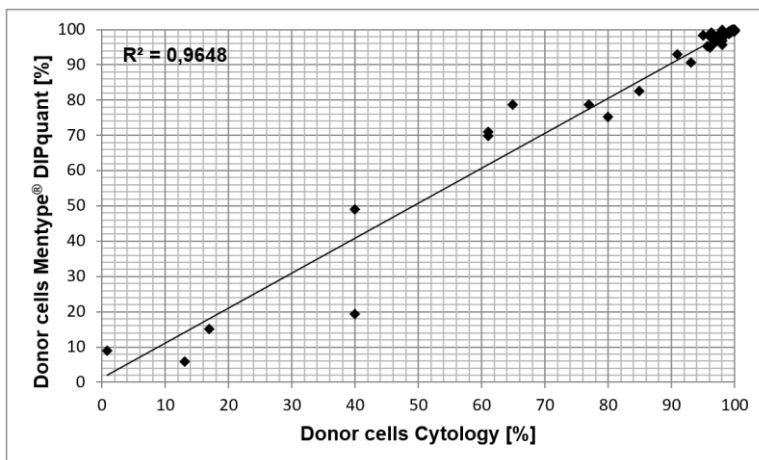
### **B c) Konkordančná analýza**

Všetci pacienti dostali transplantáciu alogenných hematopoetických kmeňových buniek v zmiešanom pohlaví a genotypizácia sa vykonávala fluorescenčnou in situ hybridizáciou (FISH) pomocou súpravy CE-IVD CEP® X SpectrumOrange / Y SpectrumGreen™ priamo značenej fluorescenčnej DNA sondy (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, DE). Analýza chimérizmu na báze PCR bola vykonaná s použitím Mentype® **DIPquant** (qPCR), Mentype® **DIPscreen** (Biotype GmbH), multiplexnou PCR kombinovanou s kapilárnou elektroforézou genetický analyzátor ABI Prism® 3100 (Applied Biosystems, Carlsbad, US-CA); a Mentype® **Chimera**® (Biotype GmbH), multiplexná PCR kombinovaná s kapilárnou elektroforézou vykonávanou s použitím genetického analyzátoru ABI Prism® 3100. Pri použití súpravy Mentype® **DIPquant** bolo na reakciu nanesené 250 ng DNA. Všetky súpravy boli použité podľa pokynov výrobcu.

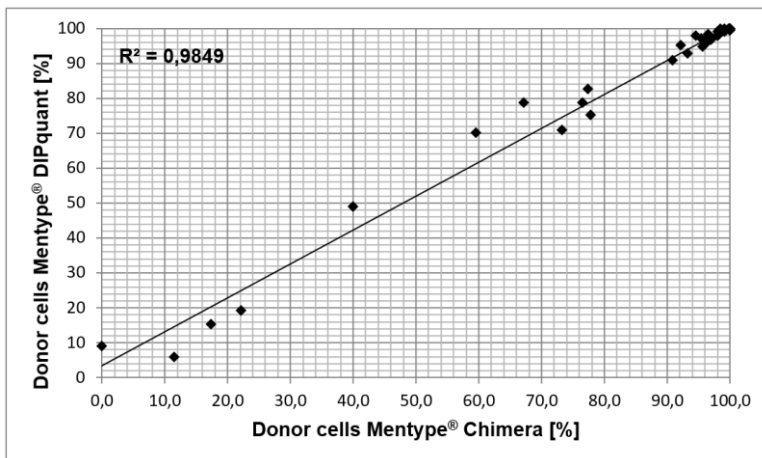
## B d) Výsledky a diskusia

Najskôr boli určené všetky informatívne STR a DIP systémy párov darca-prijemca. Okrem toho bolo pohlavie potvrdené genotypizáciou s amelogeninovým markerom, ktorý je tiež súčasťou Mentype® **DIPscreen** a Mentype® **Chimera**®. Celkom 54 vzorkov krvi ETDA bolo odobrané od 6 pacientov v rôznych dňoch po transplantácii kmeňových buniek krvi. Priemer všetkých informatívnych STR a DIP biomarkerov (2-7) bol použitý pre analýzu chimérizmu v multiplexnej genotypizácii PCR v kombinácii s kapilárnou elektroforézou. V prípade analýzy Mentype® **DIPquant** boli vybrané tri informatívne testy qPCR a referenčný gen podľa kapitoly 10.2 návodu k použitiu a analyzované v dvojacom prevedení. Obecne bol stanovený nižší podiel alel.

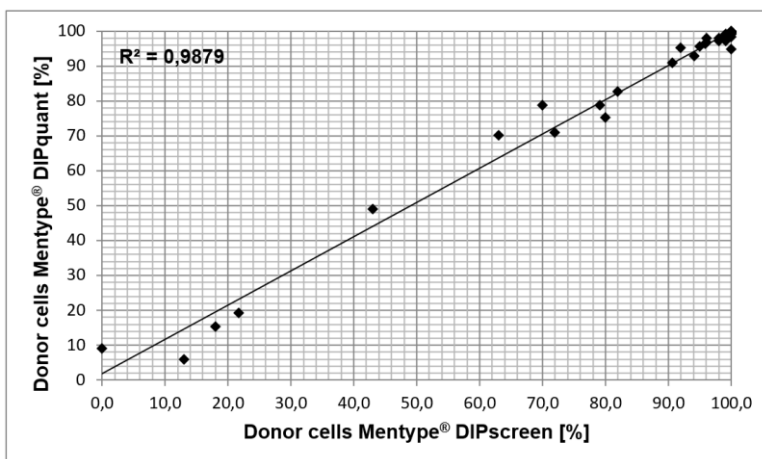
Výsledky zrovnávacieho merania sú uvedené v Obrázok 2 až v Obrázok 4 .



**Obrázok 2** Porovnanie testov Mentype® **DIPquant** s cytologiou v analýze chimérizmu



**Obrázok 3** Porovnanie vzorkov Mentype® DIPquant a Mentype® Chimera® pri analýze chimérizmu



**Obrázok 4** Porovnanie vzorkov Mentype® DIPquant a Mentype® DIPscreen pri analýze chimérizmu



Koeficient stanovení ( $R^2$ ) Mentype® **DIPquant** v zrovnání s FISH, Mentype® **Chimera**® a Mentype® **DIPscreen** bol 0,9648, 0,9849 a 0,9879. Najlepšej zhody bolo dosiahnuté s Mentype® **DIPscreen**, ktorý má rovnaké biomarkery: Nižšia zhoda s FISH odráža technické rozdiely. Podľa pokynov výrobcu by sa malo spočítať najmenej 200 buniek. Lepších výsledkov sa však dosiahne pri počtoch s viacej než 500 buňkami (Buño et al., 2005): Toho nebolo dosiahnuté u všetkých vzorkov.

Vedecká platnosť všetkých testovaných biomarkerov pre analýzu chiméry bola v literatúre široko uvedená (Thiede a kol. 2001, Thiede a Lion 2001, Wilhelm a kol. 2002, Buño a kol., 2005). Testy založené na PCR sú už akceptované v klinických pokynoch (Bader et al., 2016). Najskôr bol použitý FISH ako zrovnávací test. Táto technika má stále lokálnu hodnotu v transplantáciách, kde sa pohľadia neshodujú. U menšej bunečnej populácie však vykazuje iba citlivosť 1 %. Multiplexná PCR založená na krátkych tandemových opakovaníach (STR), ako je Mentype® **Chimera**®, sa často označuje ako zlatý štandard analýzy chimérizmu (Bader et al., 2016). Biálelické markery, ako sú DIP, ponúkajú technické výhody, ako sú žiadne kockavé píky pri kapilárnej elektroforéze alebo ich vhodnosť pre qPCR, ktoré môžu dosiahnuť citlivosti menšej než 0,1 % (Wilhelm et al., 2002; Bader et al., 2016).

## B e) Referencie

**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](http://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 (B SCT) 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

[info@biotype.de](mailto:info@biotype.de)

[www.biotype.de](http://www.biotype.de)