



Mentype[®] Chimera[®] PCR Amplification Kit

Gebrauchsanweisung

Der neue Standard in der Chimärismusanalyse

In-vitro-Diagnostikum



CHNIFU01v7de
November 2020



45-13210-0025
45-13210-0100
45-13210-0400



Chargenbezeichnung



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
D-01109 Dresden
Germany

Made in Germany

Die Biotype GmbH entwickelt, produziert und vertreibt PCR-basierte Anwendungen für die medizinische Diagnostik.

Unsere Mentype® Test Kits garantieren höchste Qualitätsstandards für Klinik und Forschung.

Für Informationen und Anregungen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung.
Kontaktieren Sie uns oder besuchen Sie unsere Homepage www.biotype.de.

Mentype® Chimera®

Produktbeschreibung

Mentype® **Chimera**® ist eine Multiplex-PCR Anwendung für die Chimärismusanalyse nach Blutstammzell- bzw. Knochenmarktransplantation. Das Kit wurde speziell entwickelt, um das Anwachsen von Spenderzellen nach Transplantation zu kontrollieren. Mentype® **Chimera**® wurde durch Chimärismusanalysen an über 200 HLA-abgestimmten Spender- und Empfängerpaaren validiert. Des Weiteren wurde die Eignung des Assays in einer klinischen Leistungsbewertung geprüft und bestätigt. Das Kit wird erfolgreich in der klinischen Routine-Diagnostik angewendet.

Die genetischen Marker des Mentype® **Chimera**® sind über 12 Chromosomen verteilt und repräsentieren hoch polymorphe Mikrosatelliten (STRs) mit einer hohen Heterozygotierate und einer ausgewogenen Allelverteilung. Diese Merkmale erhöhen die Chance informative Loci für die Spender-Empfänger Differenzierung zu finden und bieten somit Sicherheit und Robustheit für die Chimärismusanalyse.

Mit dem Mentype® **Chimera**® werden die zwölf hoch-polymorphen autosomalen Loci **D2S1360, D3S1744, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517, D8S1132, D10S2325, D12S391, D18S51, D21S2055, SE33 (ACTBP2)** und der geschlechtsspezifische **Amelogenin**-Locus simultan in einem PCR-Ansatz amplifiziert. Die Primer sind mit den Fluoreszenzfarbstoffen **6-FAM, BTG** oder **BTY** markiert.

Die Nachweisgrenze für das Mentype® **Chimera**® Kit liegt bei **200 pg genomischer DNA**. Der optimale Bereich liegt unter Standardbedingungen bei **0,2-1,0 ng DNA**.

Die Validierung und Evaluierung des Testkits wurde auf den Geräten GeneAmp® 9700 Aluminium Thermocycler, Eppendorf Mastercycler ep-S, Biometra, ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer mit POP-4® und ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer mit POP-4® durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1. Beschreibung des Mentype® Chimera®	5
2. PCR-Amplifikation	8
2.1 Ansetzen des Master Mixes	8
2.2 PCR-Amplifikationsparameter	10
3. Kapillargelelektrophorese	11
3.1 Vorbereitung der PCR-Produkte	11
3.2 Fragmentlängenanalyse.....	11
4. Auswertung	13
4.1 Biotype® Auswertevorlagen	14
4.2 Kontrollen	15
4.3 Fragmentlängen und Allele	15
5. Interpretation der Ergebnisse	22
6. Populationsgenetische Daten	24
7. Referenzen	27
8. Erklärung der Symbole	28
Spezifikationen des Mentype® Chimera® PCR-Amplifikationskits	29
A Analytische Validierung	29
A a) Festlegung der Standardreaktion und chargenspezifischer Toleranzen	29
A b) Testung der Genotypisierungsgenauigkeit	29
A c) Testung der analytischen Spezifität	30
A d) Testung der analytischen Sensitivität.....	30
A e) Testung verschiedener PCR-Thermocycler	30
A f) Testung verschiedener DNA-Mischproben	31
A g) Testung des Einflusses verschiedener Annealingtemperaturen in der PCR	31
A h) Testung verschiedener PCR-Pufferchargen	32
A i) Testung von PCR-Inhibitoren.....	32
A j) Haltbarkeit nach Anbruch	32
B Klinische Leistungsdaten	33
B a) Probenahme, ethische und regulatorische Aspekte	33
B b) Vergleichstestung.....	33
B c) DNA-Extraktion und Aufreinigung	33
B d) Ergebnisse.....	33
B e) Referenzen	34

1. Beschreibung des Mentype® Chimera®

Tabelle 1. Locus-spezifische Informationen für Mentype® Chimera®

Locus	GenBank® Accession	Repeatmotiv des Referenz Alleles	Referenz Allel	Allel- Bereich
Amelogenin X	M55418			
Amelogenin Y	M55419			
D2S1360	G08130	[TATC] ₉ [TGTC] ₉ [TATC] ₅	23	19-32
D3S1744	G08246	[TCTA] ₂ TA[TCTA] ₁₂ TCA [TCTA] ₂	16	13-22
D4S2366	G08339	[ATAG] ₉ ATTG [ATAG] ₂	12	9-15
D5S2500	G08468	[ATAG] ₁₂	12	9-18
D6S474	G08540	[TAGA] ₅ TGA [TAGA] ₁₂	17	11-20
D7S1517	G18365	[GAAA] ₁₁ CAAA [GAAA] ₂ CAAA [GAAA] ₂	17	14-31
D8S1132	G08685	[TCTA] ₉ TCA [TCTA] ₉ TCTGTCTA	20	12.1-27
D10S2325	G08790	[TCTTA] ₁₂	12	6-23
D12S391	G08921	[AGAT] ₅ GAT [AGAT] ₇ [AGAC] ₆ AGAT	19.3	13-28
D18S51	L18333	[AGAA] ₁₃	13	5.3-42
D21S2055	G27274	[CTAT] ₂ CTA [CTAT] ₉ CTA [CTAT] ₃ TAT [CTAT] ₃ TAT [CTAT] ₄ CAT[CTAT] ₂	24	16.1-39
SE33 (ACTBP2)	NG000840	[AAAG] ₉ AA [AAAG] ₁₆	25.2	3-50

Tabelle 1 zeigt die STR Loci mit ihren Repeatmotiven und Allelen. Die Nomenklatur entspricht den Leitlinien der „International Society for Forensic Genetics, (ISFG)“ (Bär et al., 1997). Für die STR Loci D8S1132 und D12S391 gilt die Nomenklatur nach Hering und Müller (2001), für die Loci D4S2366 und D6S474 die nach Becker *et al.* (2007), für den Locus D10S2325 die nach Wiegand *et al.* (1999) und für den Locus D7S1517 gilt die Nomenklatur nach Wiegand und Klintschar (2002). Der angegebene Allelbereich berücksichtigt die bekannten Allele des National Institute of Standards and Technology (NIST, Stand 12/2008) sowie die aktuelle Literatur.

Tabelle 2. Chromosomale Kartierung für den Mentype® Chimera®

Locus	Chromosomale Kartierung
Amelogenin X	Xp22.1-22.3
Amelogenin Y	Yp11.2
D2S1360	2p24-p22
D3S1744	3p24
D4S2366	4p16-15.2
D5S2500	5q11.2
D6S474	6q21-22
D7S1517	7q31.33
D8S1132	8q23.1
D10S2325	10p12
D12S391	12p13.2
D18S51	18q21.3
D21S2055	21q22
SE33	6q14.2

Inhalt

Die Mentype® **Chimera**® Kits enthalten die folgenden Komponenten ausreichend für die Durchführung von 25, 100 oder 400 Reaktionen.

Reagenzbeschriftung	Reagenz	Volumen pro Packungsgröße		
		25 Rkt.	100 Rkt.	400 Rkt.
Nuclease-Free Water	Nuklease-freies Wasser	1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Reaktionsgemisch A	125 µL	500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® Chimera ® Primer Mix	Primergemisch	63 µL	250 µL	4 x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Multi Taq 2 DNA Polymerase	10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® Chimera ® Control DNA XY5 ODER Control DNA XY1726	Kontroll-DNA XY5 (2 ng/µL) ODER Kontroll-DNA XY1726 (2 ng/µL)	10 µL	10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	DNA Längenstandard 550 (BTO)	13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® Chimera ® Allelic Ladder	Allelleiter	25 µL	25 µL	4 x 25 µL

Kitkomponenten aus verschiedenen Kitchargen dürfen nicht vermischt werden. Eine Übersicht über die Chargennummern finden Sie auf dem Etikett an der Innenseite des Boxdeckels. Das Aliquotieren der Kitkomponenten in andere Reaktionsgefäße ist nicht gestattet.

Bestellinformation

Hinweis: Bitte beachten Sie, dass die Packungsgröße 1000 Reaktionen nicht mehr verkauft wird.

Produkt	Packungsgröße	Bestellnummer
Mentype® Chimera ®	25 Reaktionen	45-13210-0025
Mentype® Chimera ®	100 Reaktionen	45-13210-0100
Mentype® Chimera ®	400 Reaktionen	45-13210-0400

Lagerung

Die Lagerung erfolgt bei –25 °C bis -15 °C. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden. Das Primergemisch und die Allelleiter sollten lichtgeschützt aufbewahrt werden. Die Kontroll-DNA und die post-PCR Reagenzien (Allelleiter und DNA-Längenstandard) sollten getrennt von den PCR Reagenzien gelagert werden. Die Haltbarkeit des Testkits ist auf dem Verpackungsetikett angegeben.

Zusätzliche Reagenzien

Für die PCR-Amplifikation und Probenvorbereitung benötigen Sie neben den im Testkit enthaltenen Bestandteilen folgende Reagenzien:

Tabelle 3. Zusätzlich benötigte Reagenzien zur Durchführung des Mentype® **Chimera**®

Reagenz	Lieferant	Bestellnummer
Hi-Di™ Formamide, 25 mL	Life Technologies Corporation	4311320
Matrix Standards BT5 single-capillary instruments (5 x 25 µL)	Biotype GmbH	00-10411-0025
Matrix Standards BT5 multi-capillary instruments (25 µL)	Biotype GmbH	00-10421-0025
Matrix Standards BT5 multi-capillary instruments (2 x 25 µL)	Biotype GmbH	00-10421-0050

Warnungen und Sicherheitshinweise

Bitte beachten Sie das Sicherheitsdatenblatt.

Für die Kitkomponenten sind die Sicherheitsdatenblätter auf Anfrage erhältlich. Für Sicherheitsdatenblätter von Reagenzien, die nicht im Testkit enthalten sind, kontaktieren Sie bitte den jeweiligen Hersteller.

Gültig bis einschließlich Kitcharge LEUK01073 (Reaction Mix A Charge CH1901224)

Folgende potenziell gefährliche Substanz ist in diesem Testkit enthalten:

Kitbestandteil	Chemikalie	Gefahr
Reaction Mix A	Natriumazid NaN ₃	giftig beim Verschlucken, entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase

Qualitätssicherung

Der gesamte Inhalt des Testkits wird einer intensiven Qualitätssicherung durch die Biotype GmbH unterzogen. Die Qualität der Testkits wird kontinuierlich überprüft, um die uneingeschränkte Verwendbarkeit zu belegen. Bitte kontaktieren Sie uns in allen Fragen zur Qualitätssicherung.

Warenzeichen und Patente

Mentype® und **Chimera**® sind eingetragene Warenzeichen der Biotype GmbH. ABI PRISM® und GeneScan® sind in Deutschland eingetragene Warenzeichen der Applied Biosystems LLC, GeneMapper®, GeneAmp® und Applied Biosystems® sind eingetragene Warenzeichen der Applied Biosystems LLC. POP-4® ist in Europa eingetragenes Warenzeichen der Applied Biosystems LLC. Die PCR ist patentrechtlich geschützt. Patentinhaber sind die Firmen Roche Molecular Systems und F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Protokolle für die PCR-Amplifikation, Elektrophorese und Auswertung

2. PCR-Amplifikation

2.1 Ansetzen des Master Mixes

Die folgende Tabelle zeigt die Volumina der eingesetzten Kitbestandteile bei 1,0 µL Probenvolumen (Template-DNA) in einem Reaktionsvolumen von 25 µL. Berücksichtigen Sie bei der Anzahl der anzusetzenden PCR-Reaktionen die Positiv- und Negativkontrolle. Fügen Sie der Gesamtanzahl ein oder zwei Reaktionen hinzu, um Pipettierfehler zu kompensieren.

Tabelle 4. Ansatz des Mastermixes für Mentype® Chimera®

Komponente	Volumen
Nuclease-Free Water	16,1 µL
Reaction Mix A*	5,0 µL
Mentype® Chimera® Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µl)	0,4 µL
Gesamtmenge des Master Mixes	24,0 µL

* enthält Mg²⁺, dNTPs, BSA

Alle Reagenzien sollten vor dem Ansetzen des Master Mixes gemischt (Vortex) und kurz zentrifugiert werden (ca. 10 s).

Die Menge der einzusetzenden DNA richtet sich nach ihrer Konzentration. Für Vergleichsproben ist meist 1 µL ausreichend. Für kritische Patientenproben kann die Templatemenge entsprechend erhöht werden. Die Menge an Nuklease-freiem Wasser ist entsprechend zu korrigieren, so dass das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes immer 25 µL beträgt.

Lagern Sie Ihre DNA-Proben in Nuklease-freiem Wasser oder in verdünntem TE Puffer (10 mM Tris HCl, pH 8,0 und 1 mM EDTA), z. B. 0,1 x TE Puffer.

Das Primergemisch sind so eingestellt, dass bei **30 PCR-Zyklen** mit **0,5 ng Kontroll-DNA XY5 bzw. XY1726** in einem Reaktionsvolumen von 25 µL ausgewogene Peakhöhen erreicht werden. Wird mehr Template-DNA eingesetzt, so sind bei kleinen PCR-Fragmenten sehr hohe Peaks und bei größeren PCR-Fragmenten verhältnismäßig niedrige Peaks zu erwarten. Reduzieren Sie die DNA-Menge, um diese Unausgewogenheit zu korrigieren.

Positivkontrolle

Hinweis: Ab Chargennummer **LEUK01071** enthält das Kit die neue Kontroll-DNA **XY1726**. Diese unterscheidet sich im Vergleich zur bisherigen Kontroll DNA XY5 im genetischen Profil. Die Konzentration und damit verbunden der experimentelle Ablauf wurden gleich belassen. Anhand der Kitchargennummer und der Inhaltsaufstellung (zu finden auf dem Kitboxlabel) können Sie feststellen, welche Kontroll-DNA im Kit enthalten ist. Das neue genetische Profil sowie die nachzuweisenden Allele sind in Abbildung 2B und Tabelle 9 zu finden.

Für die Positivkontrolle verdünnen Sie die Kontroll-DNA XY5 bzw. XY1726 auf 0,5 ng/µL in dem entsprechenden Volumen. Pipettieren Sie die verdünnte Kontroll-DNA

anstelle der Template-DNA in die Reaktionsgefäße mit dem vorgelegten PCR Master-Mix.

Negativkontrolle

Als Negativkontrolle pipettieren Sie Nuklease-freies Wasser an Stelle der Template-DNA in die Reaktionsgefäße mit dem vorgelegten PCR Master Mix.

Template-DNA

In Abhängigkeit von der angewandten Quantifizierungsmethode kann der Messwert der DNA-Konzentration variieren, so dass die optimale DNA-Menge ggf. anzugleichen ist.

2.2 PCR-Amplifikationsparameter

Um die Multi Taq 2 DNA Polymerase zu aktivieren und die Bildung von unspezifischen Amplifikationsprodukten zu unterdrücken, sollte unbedingt ein „hot start“ durchgeführt werden.

Die Zyklenzahl ist abhängig von der DNA-Menge. Für alle Proben werden 30 PCR-Zyklen empfohlen. Für kritisches Material (< 100 pg DNA) werden für eine optimale Signalintensität bis zu 32 Zyklen empfohlen.

Standard Methode

Empfohlen für alle DNA-Proben

Tabelle 5. Standard PCR Amplifikationsprotokoll

Temperatur	Zeit	
94 °C	4 min (hot start für Aktivierung der Multi Taq2 DNA Polymerase)	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	30 Zyklen
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	bis zum Ende

Optional

Empfohlen für geringe DNA-Mengen

Tabelle 6. Optionales PCR Amplifikationsprotokoll bei geringen DNA-Mengen

Temperatur	Zeit	
94 °C	4 min (hot start für Aktivierung der Multi Taq 2 DNA Polymerase)	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	32 Zyklen
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	bis zum Ende

Anmerkung: Für eine optimale Kitbalance empfehlen wir bei PCR-Geräten mit schnellen Heiz- und Kühlraten (> 2 °C/s) das Ramping auf **2 °C/s** einzustellen.

Aufgrund zu geringer DNA-Mengen kann es zu statistischen Ausfällen (Allelic Dropouts) und unausgewogenen Peakhöhen kommen. Außerdem steigt die Wahrscheinlichkeit von unspezifischen Amplifikationsprodukten. Mit zunehmender Zyklenzahl können zudem Kreuzkontaminationen durch minimale Mengen an Fremd-DNA auftreten.

3. Kapillargelelektrophorese

3.1 Vorbereitung der PCR-Produkte

Nach Beendigung der PCR entnehmen Sie die Proben dem Cycler und zentrifugieren diese kurz ab. Tauen Sie die Reagenzien Hi-Di™ Formamide (nicht im Kit enthalten) und DNA Size Standard 550 (BTO) auf, mischen Sie die Röhrchen kurz und zentrifugieren Sie diese kurz ab. Bereiten Sie den in Tabelle 7 beschriebenen Ansatz aus Hi-Di™ Formamid und dem DNA Size Standard 550 (BTO) vor, und fügen Sie dem Ansatz ein oder zwei Reaktionen hinzu, um Pipettierschwankungen zu kompensieren.

Tabelle 7. Ansatz der Denaturierungsmischung

Komponente	Volumen pro Reaktion
Hi-Di™ Formamide	12,0 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µL

Pipettieren Sie 12 µL der Denaturierungsmischung aus HiDi™ Formamid und DNA Size Standard 550 (BTO) in die entsprechende Anzahl an Wells einer PCR-Platte (geeignet für die Verwendung im Genetic Analyzer). Fügen Sie dann entweder 1 µL PCR-Produkt oder 1 µL Mentype® Chimera® Allelic Ladder (Alleleiter) pro Well hinzu. Verschließen Sie die PCR-Platte mit einer geeigneten Folie, vortexen und zentrifugieren Sie die Platte kurz ab. Entfernen Sie die Folie und verschließen Sie die Platte mit dem Septum des Geräteherstellers.

Hinweis: Die Alleleiter wird verwendet, um die während der Datenanalyse analysierten Fragmente korrekt zu bestimmen. In jedem Fragmentlängenanalyseauf muss die Alleleiter mindestens einmal analysiert werden, um eine erfolgreiche Datenanalyse sicherzustellen.

Hinweis: Die Kapillaren des Gelelektrophoresegeräts dürfen nicht trocken laufen. Wenn die Proben nicht alle Kapillarpositionen einnehmen, füllen Sie die zusätzlichen Wells der Platte mit 12 µL Hi-Di™ Formamid entsprechend der Kapillaranzahl auf.

Denaturieren Sie die vorbereiteten PCR-Produkte auf einem PCR-Cycler für 3 Minuten bei 95 °C, kühlen Sie die Proben im Cycler auf 4 °C ab. Zentrifugieren Sie die Proben vor der Fragmentlängenanalyse kurz ab.

3.2 Fragmentlängenanalyse

Allgemeine Anweisungen zum Analysegerät, der Matrixerstellung und der Anwendung der GeneMapper™ Software können der entsprechenden Anleitung *ABI PRISM® Genetic Analyzer User's Manual* entnommen werden.

Nachdem die spektrale Kalibrierung des Kapillargelelektrophoresegeräts mit dem Reagenz Matrix Standard BT5 (Biotype GmbH) erfolgreich durchgeführt wurde,

erstellen Sie ein spezifisches Laufmodul (ABI 310, ABI 3130) oder Instrumentenprotokoll (ABI 3500) mit den folgenden Parametern:

Tabelle 8. Spezifische Laufparameter zur Fragmentlängenanalyse des Mentype® **Chimera**®

	ABI 310	ABI 3130	ABI 3500
Injections Voltage [kV]	15.0	3.0	3.0
Run Time	28 min	1560 s	1560 s
Injection Time [s]	5	10	10

Abweichend von den in Tabelle 8 angegebenen Werten kann die Laufzeit angepasst werden, um alle Fragmente (60-550 bp) des DNA Size Standard 550 (BTO) zu analysieren.

Hinweis: Befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers des Kapillargel-Elektrophoresegeräts, um die spezifischen Laufparameter einzustellen.

Hinweis: Beachten Sie auch die zusätzlichen Informationen zur Kalibrierung und Anwendung der Mentype®-Produkte auf Kapillargel-Elektrophoresegeräten. Diese sind auf Anfrage über support@biotype.de bei Biotype GmbH erhältlich.

4. Auswertung

Allgemeine Anweisungen zur automatischen Auswertung können der entsprechenden Anleitung *GeneMapper® ID/ID-X Software User's Manual* entnommen werden.

Anmerkung: Bei der Auswertung des Mentype® **Chimera**® sollte das rote Panel ausgeblendet werden.

Die Ermittlung der genauen Fragmentlängen der amplifizierten Produkte ist abhängig vom Gerätetyp, von den Elektrophoresebedingungen sowie von dem verwendeten DNA Längenstandard. Aufgrund der Komplexität einiger STR-Loci sollten möglichst viele, gleichmäßig verteilte Referenzpunkte zur Längenbestimmung herangezogen werden. Hierzu verwenden Sie den DNA Size Standard 550 (BTO) mit den Fragmentlängen **60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525** und **550** bp.

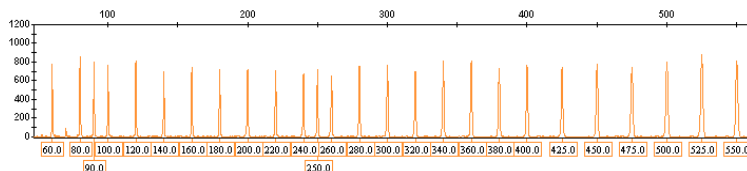


Abb. 1 Elektropherogramm des DNA Size Standard 550 (BTO), Fragmentlängen in bp

Anmerkung: Für die Auswertung und Analyse des Mentype® **Chimera**® mit der *GeneMapper® ID/ID-X Software* kann die bereitgestellte Auswertevorlage des DNA-Size Standard SST-BTO_60-500bp verwendet werden.

4.1 Biotype® Auswertevorlagen

Die Allelzuordnungen der aufgetrennten PCR-Produkte (Genotyping) kann mit Hilfe geeigneter Auswertungssoftware erfolgen, z. B. mit GeneMapper® ID/ID-X Software in Kombination mit Mentype® **Chimera**® Auswertevorlagen der Biotype. Biotype® Auswertevorlagen (Template Files) finden Sie auf unserer Homepage (www.biotype.de) zum Download. Auf Anfrage senden wir Ihnen gerne eine CD-ROM zu.

Die empfohlenen Biotype® Vorlagen für die GeneMapper® ID/ID-X Software sind:

Panels	Chimera_Panels_v1/v1X*#	oder höhere Version
BinSets	Chimera_Bins_v1/v1X*#	oder höhere Version
Size Standard	SST-BTO_60-500bp	
Analysis Method	Analysis_HID_310 Analysis_HID_3130 Analysis_HID_310_50rfu Analysis_HID_3130_50rfu	
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 Alleles Table for 10 Alleles	

#Hinweis: Auf Grund der neuen Positivkontrolle muss **ab Chargennummer LEUK01071** zur Datenauswertung das Panels und BinSet **v2** genutzt werden.

Die Panels und BinSets müssen immer verwendet werden, die weiteren Auswertevorlagen sind optional.

Zusätzliche Biotype® Vorlagen für die GeneMapper® ID-X Software:

Stutter* Chimera_Stutter_v1X*# oder höhere Version

* Beim Laden der oben genannten Panels werden die Stuttereinstellungen nicht akzeptiert, die Stutterdatei muss daher extra importiert werden.

Wichtiger Hinweis: Der Import und die Allelzuordnung mit Hilfe der angebotenen Auswertevorlagen kann nur für die GeneMapper® ID/ID-X Software garantiert werden: Sollten Sie GeneMapper® nutzen können Probleme beim Import einiger Auswertevorlagen auftreten. In diesem Fall müssten Sie die Panels und Bins mit einem oder mehreren Runs der Allelleiter auf Ihr spezifisches Gerätesetup anpassen. Kontaktieren Sie unseren Support für Hilfestellungen (support@biotype.de).

Allgemeine Vorgehensweise bei der Auswertung

1. Prüfen des Längenstandards (Size Standard)
2. Prüfen der Allelleiter (Allelic Ladder)
3. Prüfen der Positivkontrolle
4. Prüfen der Negativkontrolle
5. Probanddaten auswerten

4.2 Kontrollen

Die im Mentype® **Chimera**® enthaltene Kontroll-DNA XY5 bzw. XY1726 sowie kommerziell erhältliche DNAs repräsentieren folgende Allele:

Tabelle 9. Allelzuordnungen mit Mentype® **Chimera**®

Locus	Control DNA-XY1726	Control DNA XY5	ATCC K-562	CCR 9947A	CCR 9948	CCR 3657
Amelogenin	XY	XY	X/X	X/X	XY	XY
D2S1360	25/29	22/25	20/28	23/24	22/25	22/23
D3S1744	14/18	17/18	18/18	17/17	18/18	14/17
D4S2366	9/11	9/12	13/13	11/13	9/14	9/14
D5S2500	10/17	10/11	15/15	15/16	11/15	11/16
D6S474	14/15	15/16	14/17	13/17	16/16	15/16
D7S1517	19/25	22/27	21/24/25	19/25	20/22	24/25
D8S1132	18/22	18/20	20/24	19/21	20/24	17/18
D10S2325	9/11	13/14	7/13	9/10	8/14	9/14
D12S391	21/25	17/19	23/23	18/20	18/24	18/19
D18S51	12/13	13/15	15/16	15/19	15/18	12/20
D21S2055	19.1/21.1	25/27	28/35	19.1/26	19.1/26	19.1/25
SE33	26.2/28.2	15/21.2	26.2/28.2	19/29.2	23.2/26.2	22.2/27.2

In der Tabelle sind die Allele von Referenz-DNAs aufgezeigt, die bei ATCC bzw. bei Coriell Cell Repositories erhältlich sind. Damit wird den Anforderungen von Szibor et al. (2003) entsprochen.

4.3 Fragmentlängen und Allele

Die in Tabelle 10 bis Tabelle 12 angegebenen Werte für Fragmentlängen einzelner Allele beziehen sich auf den DNA Size Standard 550 (BTO) und die Messung am ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer mit POP-4® Polymer. Bei Verwendung anderer Analysegeräte, DNA Size Standards oder Polymere kann es zur Abweichung der Fragmentlängen kommen.

Wegen gerätespezifischer Unterschiede ist ein individuelles Einstellen am verwendeten Gerät (fine tuning) nach Messung der Fragmentlänge empfohlen.

Zusätzlich sollte ein visueller Abgleich mit der Allelleiter vorgenommen werden.

Skalierung

Horizontal: 70-480 bp

Vertikal: nach Signalintensität der Proben

Abbildung 2A

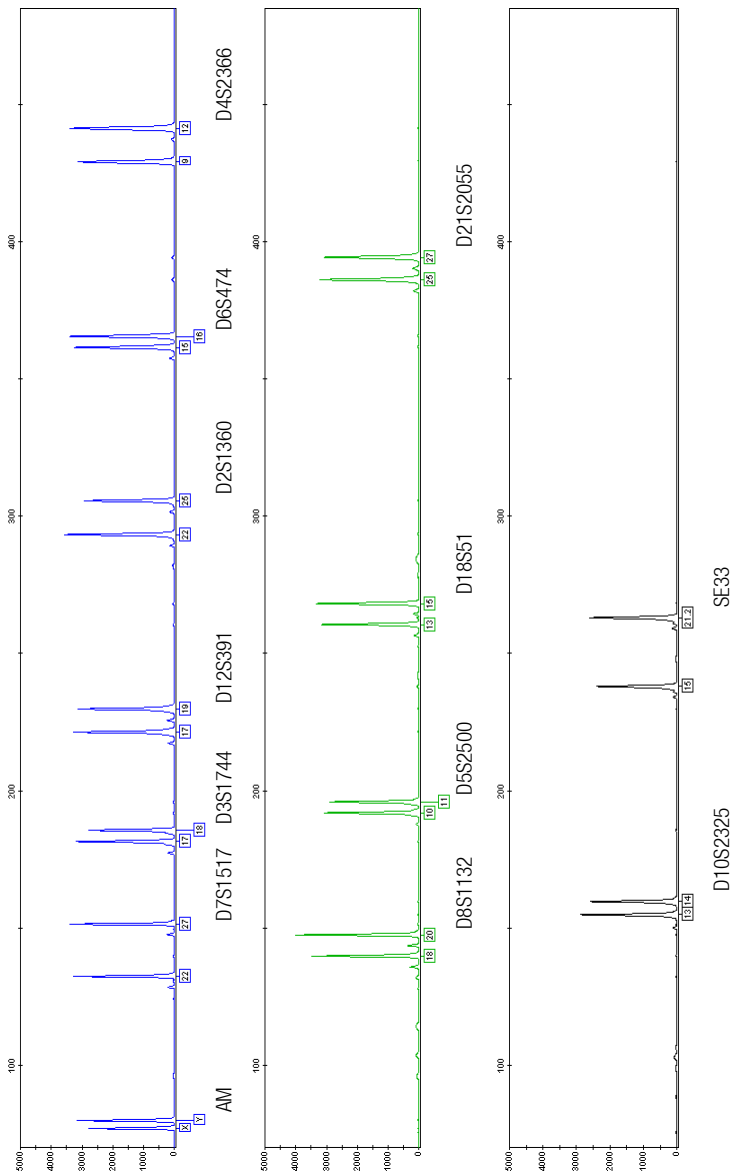


Abb. 2 Elektropherogramm des Mentype® **Chimera**® unter Verwendung von 500 pg Kontroll-DNA (A) XY5 bzw. (B) XY1726. Die Analyse erfolgte am ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer mit dem DNA Size Standard 550 (BTO). Die Allelzuordnung wurde mit der GeneMapper® ID Software und dem Mentype® **Chimera**® Template File durchgeführt.

Abbildung 2B



Abbildung 3

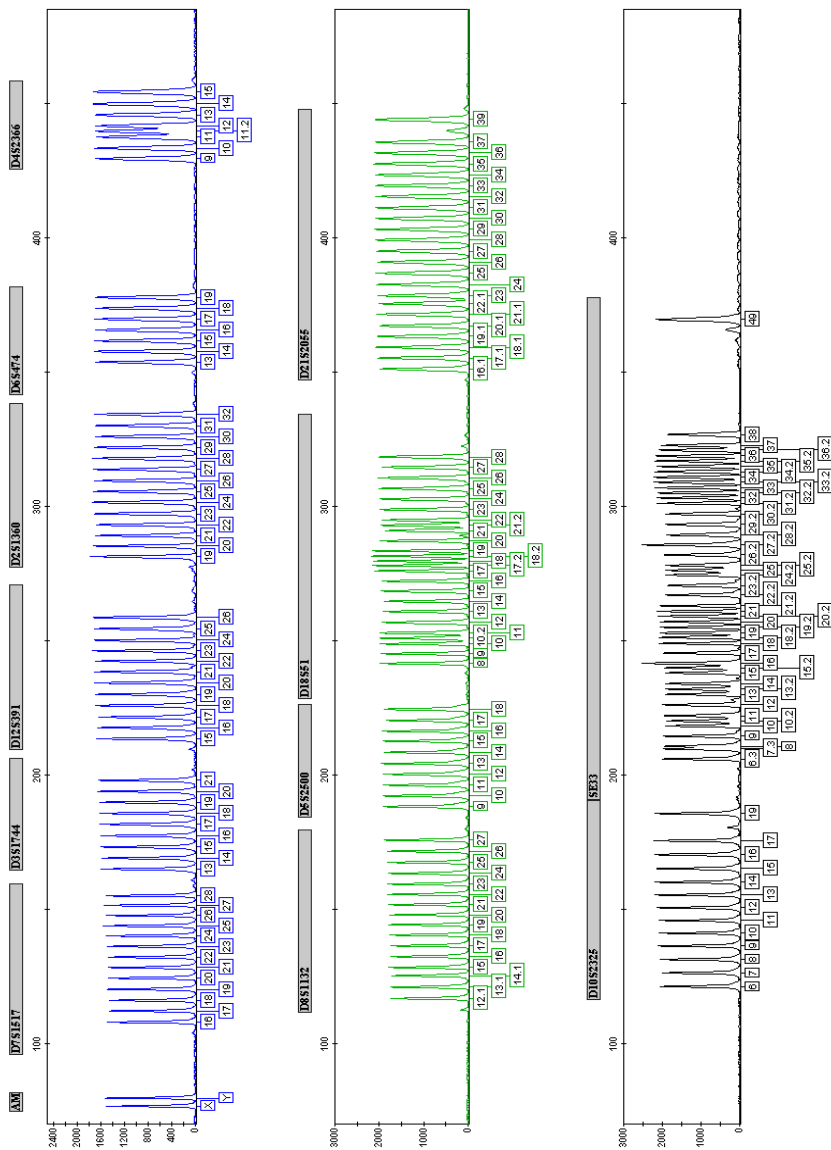


Abb. 3 Elektropherogramm der Allelleiter Mentype® Chimera® analysiert am ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer. Die Allelzuordnung wurde mit der GeneMapper® ID Software und dem Mentype® Chimera® Template File durchgeführt.

Tabelle 10. Fragmentlängen der Allelleiter Mentype® **Chimera**® gemessen am ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer mit POP-4® Polymer (blaues Panel)

Marker/ Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/ Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/ Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**
Amelogenin	6-FAM		D12S391	6-FAM		D6S474	6-FAM	
X	77		15	213		13	354	11, 12
Y	80		16	217	16.3	14	358	
			17	221	17.3	15	362	
D7S1517	6-FAM		18	226	18.3	16	366	
16	108	14, 15	19	230	19.1, 19.3	17	370	
17	112		20	234	20.3	18	374	
18	116		21	238		19	378	
19	120		22	242				
20	124		23	246		D4S2366	6-FAM	
21	128		24	250		9	429	9.2
22	132		25	254		10	433	10.2
23	136		26	258	27	11	437	
24	140					11.2	440	
25	144		D2S1360	6-FAM		12	441	
26	148		19	281		13	445	
27	152		20	285		14	449	
28	155	29	21	289		15	454	
			22	293				
D3S1744	6-FAM		23	297				
13	165		24	302				
14	169		25	306				
15	173		26	310				
16	177		27	314				
17	182		28	318				
18	186		29	322				
19	190		30	326				
20	194		31	330				
21	198	22	32	334				

Tabelle 11. Fragmentlängen der Allelleiter Mentype® **Chimera**® gemessen am ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer mit POP-4® Polymer (grünes Panel)

Marker/ Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/ Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/ Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**
D8S1132	BTG		D18S51	BTG		D21S2055	BTG	
12.1	117	12, 13	8	241	7	16.1	351	
13.1	121		9	245	9.2	17.1	355	
14.1	125	14.3	10	249		18.1	359	
15	128		10.2	251		19.1	363	
16	132		11	253	11.2	20.1	367	
17	136		12	257	12.2	21.1	371	
18	140		13	261	13.2	22.1	375	22
19	144		14	264	14.2	23	378	23.1
20	148		15	268		24	382	
21	151		16	272	16.2	25	386	
22	155		17	276		26	390	
23	159		17.2	278	17.3	27	395	
24	163		18	279		28	399	
25	167		18.2	281		29	403	
26	171		19	283	19.2	30	406	
27	175		20	287		31	411	
			21	291		32	415	
D5S2500	BTG		21.2	293		33	419	
9	188		22	295		34	423	
10	192		23	299	23.1	35	427	
11	196		24	302		36	431	
12	200		25	306		37	435	38
13	204		26	310		39	443	
14	208		27	314				
15	212		28	318	29			
16	216							
17	220							
18	224							

Tabelle 12. Fragmentlängen der Allelleiter Mentype® **Chimera**® gemessen am ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer mit POP-4® Polymer (gelbes Panel)

Marker/ Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/ Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/ Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**
D10S2325	BTY		SE33	BTY		SE33	BTY	
6	121		6.3	205	4.2, 5.3	25.2	278	
7	126		7.3	209	7	26.2	282	26
8	131		8	210	8.2	27.2[‡]	285	27
9	136		9	214	9.2	28.2	289	28, 28.3
10	141		10	218		29.2	293	29
11	145		10.2	220		30.2	297	30
12	150		11	222	11.2	31.2	301	31
13	155		12	226	12.2	32	303	
14	160		13	230		32.2	305	
15	165		13.2	232	13.3	33	307	
16	170		14	234	14.2, 14.3	33.2	309	
17	175	18	15	238		34	311	
19	185		15.2	240		34.2	313	
			16[‡]	241	16.2, 16.3	35	315	
			17	245	17.2, 17.3	35.2	317	
			18	249		36	318	
			18.2	251	18.3	36.2	321	
			19	253		37	322	37.2
			19.2	255		38	326	39,42
			20	257	20.1	49	369	50
			20.2	259				
			21	261				
			21.2	263	22			
			22.2	267				
			23.2	270	23			
			24.2	274	24			
			25	276				

* gerundet auf ganze Zahlen

** Diese „off-ladder“ Allele des Biotype DNA Pools werden mit den aktuellen Biotype® Template Files für die GeneMapper® ID (ID-X Software zugeordnet. Für weitere Allele siehe u.a. http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm

‡ Diese Allele werden zur besseren Orientierung innerhalb der Allelleiter verstärkt dargestellt.

5. Interpretation der Ergebnisse

Durch die vorher beschriebene Auswertung mit automatischer Allelzuordnung wird eine genaue und zuverlässige Unterscheidung der Allele gewährleistet.

Eine Berechnung des Spender-DNA-Anteils kann direkt aus den Rohdaten einer Fragmentanalyse durchgeführt werden.

Um Ergebnisse, die mit dem Mentype® **Chimera**® erzielt wurden, mit Ergebnissen zytologischer Untersuchungen (Fish-Analyse) vergleichen zu können, müssen bei der zytologischen Untersuchung mindestens 500 Leukozyten eingesetzt werden.

Überstrahlungen (Pull-up Peaks)

Es kann zu Überstrahlungen zwischen den Farbpanels kommen, wenn eine ungeeignete Matrix für die Analyse verwendet wird oder die Peakhöhen außerhalb des linearen Detektionsbereiches des Gerätes liegen. Überstrahlungen sind daran zu erkennen, dass sie an der gleichen Position wie spezifische Peaks, jedoch in anderen Farbpanels (in der Regel mit niedrigeren Signalintensitäten) erscheinen.

Stotterbanden (Stutter Peaks)

Das Auftreten von Stotterbanden hängt von der Sequenz und Anzahl der Wiederholungseinheiten ab. Bei Tetranukleotid STR Motiven entstehen durch Fehler der Taq DNA Polymerase während der PCR n-4 Peaks, d. h. der Stutterpeak ist 4 Basen kleiner als das wahre Allel. Wiederholungseinheiten werden innerhalb des STR übersprungen. Zur Bewertung der Peaks gelten die Vorgaben der Template Files für die GeneMapper™ ID/ID-X Software.

Template-unabhängige Anheftung von Nukleotiden

Die Taq DNA Polymerase hängt aufgrund ihrer terminalen Transferase-Aktivität bevorzugt ein Adenosin an das 3'-Ende des amplifizierten DNA-Fragments an. Wenn dem PCR-System nicht genügend Zeit für die Extension zur Verfügung steht oder wenn die Primersequenzen die Extension nicht begünstigen, findet diese Anheftung nicht statt. Dieses Artefakt ist durch das Auftreten eines um eine Base verkürzten Fragments (-1 bp Peak) erkennbar. Alle Biotype® Primer sind so gestaltet, dass diese Artefaktbildung minimiert wird. Zusätzlich wird die Bildung des Artefakts durch den abschließenden Extensionsschritt im PCR-Protokoll (68 °C für 60 min) reduziert. Die Peakhöhe des Artefakts nimmt bei hohen DNA-Mengen zu. Zur Bewertung der Peaks sollte jedes Analyselabor hierfür eigene Grenzwerte festlegen.

Artefakte

Die Raumtemperatur kann das Laufverhalten der PCR-Produkte an Kapillargeräten stark beeinflussen und bei zu geringer Temperatur zum Auftreten von Schultern oder Doppelpeaks (Split Peaks) führen. Außerdem kann die automatische Allelzuordnung beeinträchtigt sein. Sollten diese Effekte beobachtet werden, empfehlen wir eine erneute Injektion der Proben eventuell auch mit mehreren Allelleitern pro Run.

Einfluss des Polymertyps

Mentype® **Chimera**® wurde auf POP-4® validiert und zertifiziert. Die Verwendung eines anderen Polymers (z.B. POP-7 oder POP-6) kann das Laufverhalten und die Peakform der spezifischen PCR-Produkte verändern. Außerdem wurde ein erhöhtes Hintergrundrauschen durch ein verändertes Verhalten von freien Fluoreszenzfarbstoffresten beobachtet.

6. Populationsgenetische Daten

Die wichtigsten populationsgenetischen Daten für jeden STR Marker sind in den folgenden Tabellen 13-16 angegeben. Die Formel für die Berechnung des **Polymorphism Information Content** (PIC) wurde von Botstein et al. (1980) publiziert, die für die **Expected Heterozygosity** (HET) von Nei und Roychoudhury et al. (1974) sowie die Formel für die Berechnung der **Power of Discrimination** (PD) von Jones et al. (1972) veröffentlicht wurde. Alle Formeln sind für autosomale Marker geeignet.

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 - 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n f_i^2 f_j^2$$

$$\text{HET} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{j=1}^K f_j^2 \right)$$

$$\text{PD} = 1 - \sum_j f_j^2$$

Tabelle 13. Populationsgenetische Daten

Marker D2S1360		Marker D3S1744		Marker D4S2366	
Allel	Allelfrequenz	Allel	Allelfrequenz	Allel	Allelfrequenz
19	0.007	13	0.007	9	0.347
20	0.126	14	0.104	10	0.179
21	0.060	15	0.053	11	0.074
22	0.309	16	0.100	12	0.147
23	0.142	17	0.319	13	0.168
24	0.098	18	0.197	14	0.074
25	0.086	19	0.130	15	0.011
26	0.093	20	0.067		
27	0.035	21	0.023		
28	0.023				
29	0.012	PIC	0.790	PIC	0.760
30	0.002	PD	0.943	PD	0.919
31	0.005	HET	0.792	HET	0.795
32	0.002				
PIC	0.820				
PD	0.955				
HET	0.856				

Tabelle 14. Populationsgenetische Daten

Marker D5S2500		Marker D6S474		Marker D7S1517	
Allel	Allelfrequenz	Allel	Allelfrequenz	Allel	Allelfrequenz
9	0.007	13	0.246	16	0.007
10	0.084	14	0.212	17	0.007
11	0.313	15	0.154	18	0.049
12	0.161	16	0.285	19	0.120
13	0.061	17	0.097	20	0.101
14	0.042	18	0.005	21	0.099
15	0.213			22	0.082
16	0.103	PIC	0.740	23	0.077
17	0.009	PD	0.918	24	0.155
18	0.007	HET	0.733	25	0.230
				26	0.054
				27	0.014
PIC	0.780			28	0.005
PD	0.938				
HET	0.804				
				PIC	0.860
				PD	0.967
				HET	0.826

Tabelle 15. Populationsgenetische Daten

Marker D8S1132		Marker D10S2325		Marker D12S391	
Allel	Allelfrequenz	Allel	Allelfrequenz	Allel	Allelfrequenz
16	0.007	6	0.002	15	0.035
17	0.095	7	0.102	16	0.019
18	0.221	8	0.056	17	0.107
19	0.153	9	0.121	17.3	0.019
20	0.128	10	0.142	18	0.215
21	0.119	11	0.144	18.3	0.007
22	0.133	12	0.193	19	0.121
23	0.077	13	0.133	19.3	0.016
24	0.056	14	0.065	20	0.117
25	0.005	15	0.037	21	0.093
26	0.005	16	0.005	22	0.114
27	0.002			23	0.072
		PIC	0.860	24	0.040
PIC	0.850	PD	0.967	25	0.021
PD	0.964	HET	0.851	26	0.002
HET	0.828				
				PIC	0.870
				PD	0.971
				HET	0.893

Tabelle 16. Populationsgenetische Daten

Marker D18S51		Marker D21S2055		Marker SE33 (ACTBP2)	
Allel	Allelfrequenz	Allel	Allelfrequenz	Allel	Allelfrequenz
10	0.005	16.1	0.056	11	0.002
12	0.103	17.1	0.021	12	0.014
13	0.110	18.1	0.023	13	0.002
14	0.157	19.1	0.274	13.2	0.002
15	0.199	20.1	0.040	14	0.026
16	0.161	21.1	0.019	15	0.049
17	0.112	22.1	0.005	16	0.047
18	0.072	23	0.007	17	0.070
19	0.028	25	0.112	17.3	0.002
20	0.030	26	0.116	18	0.044
21	0.021	27	0.016	18.3	0.002
24	0.002	28	0.007	19	0.082
		29	0.030	19.2	0.009
PIC	0.850	30	0.021	20	0.044
PD	0.964	31	0.023	20.2	0.009
HET	0.902	32	0.026	21	0.035
		33	0.067	21.2	0.019
		34	0.074	22	0.007
		35	0.053	22.2	0.035
		36	0.007	23.2	0.023
		37	0.002	24	0.002
				24.2	0.035
		PIC	0.870	25.2	0.044
		PD	0.971	26.2	0.040
		HET	0.856	27.2	0.084
				28.2	0.084
				29.2	0.051
				30	0.002
				30.2	0.061
				31.2	0.028
				32.2	0.023
				33	0.009
				33.2	0.005
				34	0.002
				36	0.002
				PIC	0.950
				PD	0.990
				HET	0.949

Alle populationsgenetischen Daten basieren auf einer von der Biotype GmbH durchgeführten Studie an ca. 210 unverwandten Kaukasiern.

7. Referenzen

- Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayr W, Olaisen B (1997)** DNA Recommendations. Further report of the DNA commission of the ISFG regarding the use of short tandem repeat systems. *Int J Legal Med* 110:175-176.
- Becker D, Vogelsang D, Brabetz W (2007)** Population data on the seven short tandem repeat loci D4S2366, D6S474, D14S608, D19S246, D20S480, D21S226 and D22S689 in a German population. *Int J Legal Med* 121:78-81.
- Botstein D, White RI, Skolnick M, Davis RW (1980)** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331.
- Hering S, Müller E (2001)** New allele and mutational events in D12S391 and D8S1132: sequence data from an eastern German population. *Forensic Sci Int* 124:187-191.
- Jones DA (1972)** Blood samples: Probability of Discrimination. *J Forensic Sci Soc* 12:355-359.
- Nei M, Roychoudhury AK (1974)** Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76:379–390.
- Szibor R, Edelmann J, Hering S, Plate I, Wittig H, Roewer L, Wiegand P, Cali F, Romano V, Michael M (2003)** Cell line DNA typing in forensic genetics – the necessity of reliable standards. *Forensic Sci Int* 138 37-43.
- Wiegand P, Lareu M. V., Schürenkamp M (1999)** D18S535, D1S1656 and D10S2325: three efficient short tandem repeats for forensic genetics. *Int J Legal Med* 112:360-363.
- Wiegand P, Klintschar M (2002)** Population genetic data, comparison of the repeat structure and mutation events of two short STRs. *Int J Legal Med* 116:258-261.

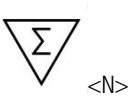
8. Erklärung der Symbole



Hersteller



Chargenbezeichnung



Ausreichend für <N> Tests



Hinweis auf eIFU



Verwendbar bis



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-vitro-Diagnostika



Vor Sonnenlicht schützen



Trocken aufbewahren

Spezifikationen des Mentype® Chimera® PCR-Amplifikationskits

A Analytische Validierung

A a) Festlegung der Standardreaktion und chargenspezifischer Toleranzen

Zielsetzung: Festlegung der Standardreaktion und der chargenspezifischen Toleranzen in Bezug auf die relative Signalhöhen (RFU), die Ausgewogenheit der Signalhöhen der Multiplex-PCR und der Basislinie.

Methodik: Dem Testkit ist eine Kontroll-DNA beigelegt, welche in den meisten STR-Systemen heterozygot ist. Die Standardreaktion erfolgte mit der Kontroll-DNA in der Nennkonzentration von 500 pg in Vierfachbestimmung. Vier Blindwerte (no template control, NTC) ohne DNA wurden ebenfalls durchgeführt.

Ergebnisse: Für die chargenspezifische Abmischung der PCR-Primer wurden folgenden Spezifikationen festgelegt: Unter Verwendung eines *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer* Signalhöhen von 1 000-4 000 RFU und unter Verwendung eines *ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer* wurden Signalhöhen von 1 000-5 000 RFU festgelegt. Die Schwankungen für Signalhöhen von heterozygoten Systemen darf maximal 30 % vom Richtwert betragen. Im Skalierungsbereich wurden bei den Blindwerten keine unspezifischen Signale ≥ 50 RFU festgestellt (Basislinie).

A b) Testung der Genotypisierungsgenauigkeit

Zielsetzung: Die Genauigkeit der Allelzuordnung ist unter Standardbedingungen statistisch abgesichert. Die Testung überprüft das automatische *Allele Calling* mit der Allelleiter und die Konkordanz der Allelzuordnung im Vergleich zur Vortypisierung der Prüf-DNAs mittels anderer Methoden (andere PCR-Kits, Direktsequenzierung o.a.) mit Hilfe der GeneMapper ID Software. Anhand der Ergebnisse sind die testspezifischen Geräteeinstellungen für die Genotypisierung mittels Kapillargelelektrophorese (Bins und Panels) und der Anteil von Stutterpeaks für die Auswertevorlagen der DNA-Sequenzierautomaten festgelegt.

Methodik: Es wurden 80 vortypisierte humane DNAs von freiwilligen Spendern aus unterschiedlichen Quellen (Vollblut, Wangenabstriche) in Einfachbestimmung untersucht. Zusätzlich wurde ein Blindwert ohne DNA mitgeführt. Als Akzeptanzkriterium wurden Vollprofile mit Peakhöhen ≥ 50 RFU (manuelle Auswertung) definiert.

Ergebnisse: Allen DNA-Proben konnte nach Festlegung der testspezifischen Geräteeinstellungen für alle STR-Systeme und den Amelogeninmarker der richtige Genotyp zugeordnet werden.

A c) Testung der analytischen Spezifität

Zielsetzung: Die Untersuchung dient dem Ausschluss falsch positiver Ergebnisse infolge Kreuzreaktivität mit ausgewählten nicht-humanen DNA-Proben. In der klinischen Praxis kann jedoch nicht-humane DNA auf Grund der sterilen Probenahme weitgehend ausgeschlossen werden.

Methodik: Es wurde 2,5 ng genomische DNA von *Bos taurus* (Rind), *Sus scrofa domestica* (Hausschwein), *Canis lupus familiaris* (Hund), *Felis catus* (Katze) und *Oryctolagus cuniculus* (Hauskaninchen) getestet. Die DNA aus Tieren stammte von Blutproben, welche als Restmaterial veterinärmedizinischer Untersuchungen zur Verfügung gestellt wurden.

Ergebnisse: Im Allelbereich wurde keine Kreuzreaktivität festgestellt (< 200 RFU).

A d) Testung der analytischen Sensitivität

Zielsetzung: Die Untersuchung dient der Bestimmung der analytischen Nachweisgrenze (Sensitivität).

Methodik: Es wurde eine Verdünnungsreihe mit 500 pg bis 31,5 pg Referenz-DNA in Vierfachbestimmung getestet. Als Akzeptanzkriterium wurden komplette DNA-Profile mit ≥ 200 RFU definiert.

Ergebnisse: Es wurde eine Nachweisgrenze von 200 pg genomischer DNA ermittelt.

A e) Testung verschiedener PCR-Thermocycler

Zielsetzung: PCR-Thermocycler unterschiedlicher Hersteller unterscheiden sich in ihren Spezifikationen. Insbesondere können unterschiedliche Heiz- und Kühlraten sowie unterschiedliche Temperaturregelungstechniken vorliegen.

Methodik: Testung der Standardreaktionen mit Kontroll-DNA in der Nennkonzentration von 500 pg wurden mit folgenden Thermocyclern in 4-fach Bestimmung mit gleichem Mastermix und 2 Blindproben ohne DNA durchgeführt: Thermocycler *GeneAmp 9700* mit Aluminiumblock (Life Technologies, Division Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt) zusätzlich die Geräte *GeneAmp 9700* mit Silberblock (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt), DNA Engine (PTC-200) Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München), *Biometra T1* (Biometra GmbH, Göttingen), *Techne® TC-512 Thermal Cycler* (biostep GmbH, Jahnsdorf) und *Eppendorf Mastercycler ep-S* (Eppendorf AG, Hamburg).

Ergebnisse: Es wurden keine unspezifischen Nebenprodukte ≥ 200 RFU nachgewiesen. Die Abweichung der gemittelten Peakhöhen im Vergleich zur Standardreaktion betrug bei einem definierten Ramping von 2 °C/s maximal 20 %.

A f) Testung verschiedener DNA-Mischproben

Zielsetzung: Ziel in der Chimärismusanalyse nach allogener Blutstammzelltransplantation ist der Nachweis und die relative Quantifizierung der Spender- und Empfänger-DNA Anteile. Zum Nachweis der Minimalen Resterkrankung sollen in einer Mischprobe möglichst geringe Mengen an Spender- oder Empfänger-DNA nachgewiesen werden.

Methodik: Es wurden 3 unabhängige Gemische zweier DNAs hergestellt, wobei die unterschüssige DNA zu 0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 % eingesetzt wurde. Die DNAs in den Gemischen zeigten mindestens 3 STR-Loci mit vier informativen Allelen. Jeweils 1 ng der DNA-Gemische wurde in der Standardreaktion in vier Parallelansätzen getestet. Es wurden Signalhöhen von mindestens 50 RFU ausgewertet.

Ergebnisse: Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt. Für die unterschüssige DNA konnte eine Nachweisgrenze von 1 % erreicht werden. Dies entspricht den Werten 1-5 %, welche mit forensischen STR-Kits bei der Chimärismusanalyse erreicht werden.

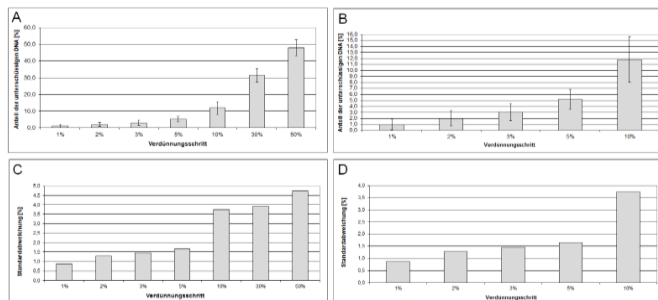


Abb. 4: Testung von DNA-Gemischen. (A, B) Mittelwerte und Standardabweichung der aus den Signalhöhen der Kapillargelelektrophorese berechneten Anteile der unterschüssigen DNA. (C, D) Standardabweichungen zu A und B.

A g) Testung des Einflusses verschiedener Annealingtemperaturen in der PCR

Zielsetzung: Zur Bestimmung der Robustheit der PCRs werden Temperaturschwankungen für den Primeranlagerungsschritt (Annealing) der Multiplex-PCR simuliert. Dieser Temperaturschritt ist kritisch für die Sensitivität und Spezifität der PCRs.

Methodik: Die kitspezifische Annealingtemperatur von 60 °C der Standardreaktion mit Kontroll-DNA in der Nennkonzentration von 500 pg wurde um ± 1 °C und ± 2 °C variiert. Es erfolgte eine 3-fache Bestimmung mit dem gleichen Mastermix.

Ergebnisse: Für ± 1 °C wurden keine unspezifischen Nebenprodukte ≥ 200 RFU festgestellt. Die gemittelten Peakhöhen wichen bei ± 1 °C maximal ± 30 % von der Standardreaktion ab. Für ± 2 °C wurde kein allelicher Signalausfall < 200 RFU festgestellt.

A h) **Testung verschiedener PCR-Pufferchargen**

Zielsetzung: Die Konzentrationsverhältnisse der Inhaltsstoffe des PCR-Puffers Reaktionsgemisch A (dNTPs, Ionenkonzentrationen, insbesondere Mg^{2+}) sind für Sensitivität, Spezifität und Ausgewogenheit der Signale in der Multiplex-PCR entscheidend. Deshalb wird die Robustheit des Tests gegenüber Chargenschwankungen des mitgelieferten PCR-Puffers getestet.

Methodik: Die Testung von 3 unabhängigen Reaktionsgemisch-A-Chargen erfolgte in der Standardreaktion mit Kontroll-DNA der Nennkonzentration von 500 pg.

Ergebnisse: Es wurden keine unspezifischen Nebenprodukte ≥ 50 RFU nachgewiesen. Die Abweichung der gemittelten Peakhöhen im Vergleich zur Standardreaktion betrug maximal 20 %.

A i) **Testung von PCR-Inhibitoren**

Zielsetzung: Hämatin aus Hämoglobin ist ein potenter Inhibitor der *Taq* DNA Polymerase. Es kann bei unzureichender DNA-Aufreinigung aus stabilisiertem Vollblut nicht vollständig entfernt werden.

Methodik: Die Auswirkung von *Hematin porcine* (Sigma-Aldrich, Freiburg) wurde in Endkonzentrationen von 0-250 μ M in der Standardreaktion mit Kontroll-DNA der Nennkonzentration von 500 pg getestet.

Ergebnisse: Vollständige Profile (≥ 50 RFU) wurden bis zu einer Inhibitor-Endkonzentration von 100 μ M *Hematin porcine* erreicht. Ab einer Endkonzentration von 150 μ M konnten keine vollständigen Profile mehr erreicht werden (Teilprofile).

A j) **Haltbarkeit nach Anbruch**

Zielsetzung: Die Stabilität der Reagenzien des PCR-Kits wurde nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen getestet.

Methodik: Die Kitreagenzien wurden einem 20-fachen Einfrier- und Auftauzyklus unterworfen. Das Einfrieren wurde mindestens für 1 h bei -20 °C durchgeführt. Auftaut wurde bei Raumtemperatur und die Reagenzien wurden vor Gebrauch durch Schütteln homogenisiert. Anschließend wurde eine Standardreaktion mit Kontroll-DNA der Nennkonzentration von 500 pg und zusätzlichen Blindwerten ohne DNA in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Bewertung erfolgte im Vergleich zu einer Standardreaktion ohne Einfrier- und Auftauzyklus.

Ergebnisse: Die Abweichung der gemittelten Peakhöhen im Vergleich zur Standardreaktion betrug maximal 20 % (insbesondere Signalverlust). Bei den Blindwerten wurden keine zusätzlichen Peaks > 50 RFU innerhalb des Skalierungsbereiches festgestellt.

B Klinische Leistungsdaten**B a) Probenahme, ethische und regulatorische Aspekte**

Es wurde eine Leistungsbewertungsprüfung nach den §§ 20 bis 24 Medizinproduktegesetz (DE) durchgeführt. Die Befreiung von der Genehmigungspflicht für Medizinprodukte mit geringem Sicherheitsrisiko gemäß § 7 Verordnung über klinische Prüfungen von Medizinprodukten wurde vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte erteilt. Ein zustimmendes Votum der zuständigen Ethikkommission und Patienteneinverständniserklärungen lagen vor.

Es wurde heparinisiertes venöses Vollblut verwendet.

B b) Vergleichstestung

Als Vergleichstest diente die zytogenetische Unterscheidung von Spender- und Empfängerleukozyten mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridierung (FISH). Es wurde das geschlechtschromosomen-spezifische CE-IVD CEP® X SpectrumOrange™ / Y SpectrumGreen™ Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, DE) nach Angaben des Herstellers verwendet.

B c) DNA-Extraktion und Aufreinigung

Die DNA-Extraktion aus heparinisiertem Vollblut erfolgte mit dem QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE) nach Angaben des Herstellers.

B d) Ergebnisse

Es wurden insgesamt 103 Meßdatensets von erwachsenen Patienten an verschiedenen Tagen nach allogener Blutstammzell- oder Knochenmarktransplantation erhoben. Die Spender-Empfänger-Paare unterschieden sich im genetischen Geschlecht und waren somit geeignet für die geschlechtschromosomen-spezifische FISH. Pro PCR wurden mindestens 1,5 ng genomische DNA eingesetzt. Zunächst wurden alle informativen STR-Systeme der Spender-Empfänger-Paare ermittelt und das Geschlecht durch Genotypisierung des Amelogeninmarkers, welcher Bestandteil der Multiplex-PCR ist, bestätigt. Für die PCR-Befundung wurden Mittelwerte der Signalhöhen aller informativer STR verwendet (mindestens 2). Die Ergebnisse der Vergleichstestungen sind in Abb. 5 zusammengefasst.

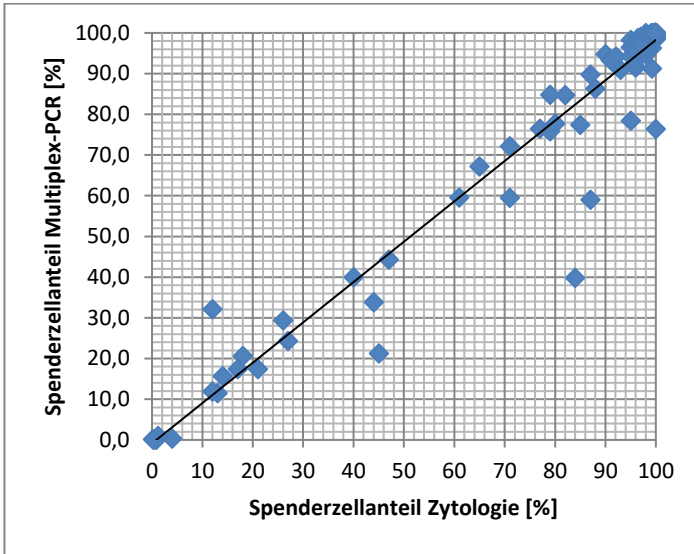


Abb. 5: Konkordanzanalyse der Multiplex-PCR im Vergleich zur Zytologie.

Bei 92 der 103 Messdatensets (90,3 %) betrug die Abweichung der Befunde der Multiplex-PCR von der Zytogenetik weniger als 5 %. Größere Abweichungen wurden ausschließlich bei zytogenetischen Befunden beobachtet, bei welchen die Gesamtzahl der ausgezählten Zellen 500 oder weniger betrug. Gemäß Empfehlungen des Herstellers des FISH-Kits sollten mindestens 200 Zellen ausgezählt werden. Nach Praxisempfehlungen liefern jedoch höhere absolute Zellzahlen (500–1 000) bessere zytogenetische Ergebnisse [1, 2].

B e) Referenzen

- 1) **Thiede C.** Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. *Am J Pharmacogenomics* 2004; 4: 177-87.
- 2) **Mohr B, Koch R, Thiede C, Kroschinsky F, Ehninger G, Bornhäuser M.** CD34+ cell dose, conditioning regimen and prior chemotherapy: factors with significant impact on the early kinetics of donor chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 949-54.

Biotype GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 Dresden

Tel. +49 351 8838 400

Fax +49 351 8838 403

info@biotype.dewww.biotype.de