

Mentype[®] DIPquant

Gebrauchsanweisung

Die qPCR-Anwendung zur allelspezifischen Quantifizierung des Chimärismus Status

In-Vitro-Diagnostikum



DIQIFU01v5de
August 2019



45-015xx*-0025
45-015xx*-0050
45-01591-0100



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
D-01109 Dresden
Germany

xx* - definiert die Locus-spezifische Artikelnummer

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

Inhaltsverzeichnis

1. Bestimmungsgemäße Verwendung	5
2. Hintergrundinformationen	5
3. Produktbeschreibung Mentype® DIPquant	5
3.1 qPCR Instrument	6
3.2 Probentyp	6
3.3 Sensitivität/Spezifität	6
3.3.1 Messbereich Chimärismus	6
3.3.2 Sensitivität und Spezifität	6
4. Warnungen und Sicherheitshinweise	8
4.1 Qualitätssicherung	8
5. Mitgelieferte Materialien	9
5.1 Kit Inhalt	9
5.2 Bestellinformation	9
5.3 Benötigte Reagenzien und Geräte, die nicht im Kit enthalten sind	9
6. Lagerung	10
7. Arbeitsablauf	11
7.1 Überblick der Chimärismusanalyse mit Mentype®DIP-Produkten	11
7.2 Probenvorbereitung und DNA-Einsatzvolumen	11
7.2.1 DNA Isolation	11
7.2.2 Einsatz Template-DNA	12
7.3 Ansetzen des Mastermixes	12
7.3.1 Positivkontrolle	13
7.3.2 Negativkontrolle	13
7.4 Reaktionsansatzvolumen	14
8. qPCR Programm und Amplifikation	14
8.1 Geräteeinstellungen und Amplifikationsparameter	14
8.2 Detektionsparameter	14
8.3 qPCR Amplifikationsparameter*	14
9. Empfohlenes Analyse-Setup	15
9.1 Quantifizierung vor der Transplantation (pre-HSCT)	15
9.2 Quantifizierung nach Transplantation / Monitoring (post-HSCT)	16
10. Auswertung	17
10.1 Datenanalyse	17
10.2 Prüfen der Ergebnisse	17
11. Quantifizierung	18
11.1 Quantifizierung der prä-HSCT Proben	18
11.2 Quantifizierung der Post-HSCT Proben	18
12. Interpretation ungewöhnlicher Ergebnisse	19
12.1 Geringe Signalstärke oder kein Signal detektiert	19

12.2 Schwankungen der Signalstärke innerhalb der Replikate	19
12.3 Signale der Empfänger-spezifischen Assays in der Donor DNA	20
13. Bestellinformationen	21
14. Referenzen	23
15. Marken und Haftungsausschluss	24
16. Symbole	25
A Analytische Leistungsdaten (Verifizierung)	26
A a) Humane DNA	26
A b) Analytischen Spezifität und Limit of Blank (LoB)	26
A c) Analytischen Sensitivität und Limit of Detection (LoD).....	26
A d) Messbereich der Assays	27
A e) Testung Chargenschwankungen und Performance am LoD	27
A f) Messung an zwei verschiedenen Tagen	28
A g) Haltbarkeit nach Anbruch	29
B Klinische Leistungsdaten.....	30
B a) Ethische und regulatorische Aspekte	30
B b) Präanalytik, DNA-Isolation und DNA-Quantifizierung	30
B c) Konkordanzanalyse.....	30
B d) Ergebnisse und Diskussion	31
B e) Referenzen	33

Mentype[®] DIPquant

1. Bestimmungsgemäße Verwendung

Mentype[®] **DIPquant** Anwendungen sind auf der real-time PCR Technologie (qPCR) basierende In-vitro Diagnostika für die allelspezifische und quantitative Analyse des molekularen Chimärismus nach allogener Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation unter Verwendung von Deletionen / Insertionen Polymorphismen (DIPs, auch als INDELS bezeichnet, siehe 14 Referenzen).

Mentype[®] **DIPquant** Anwendungen sind ausschließlich für den beruflichen Gebrauch in spezialisierten Laboratorien bestimmt. Das Personal sollte für die Techniken der qPCR und der Anwendung von In-vitro-Diagnostika geschult sein.

2. Hintergrundinformationen

Die Analyse des molekularen Chimärismus nach allogener Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation ist entscheidend, um das Anwachsen des Transplantates zu überwachen bzw. um eine drohende Abstoßungsreaktion frühzeitig zu erkennen. Die molekulare Chimärismusanalyse erfolgt über den Nachweis individualspezifischer Deletions / Insertions DNA-Polymorphismen, welche im Vergleich zu anderen DNA-Sequenzmotiven sehr gut für die Analyse mittels allel-spezifischer qPCR geeignet sind.

Im Anschluss an die Identifizierung informativer DIP-Loci des Patienten und des Spenders mit dem CE-IVD Mentype[®] **DIPscreen** Kit kann mit den entsprechenden Mentype[®] **DIPquant** Singleplex-Assays die quantitative Chimärismusanalyse erfolgen. Das flexible Assay Format erlaubt sowohl die Analyse einzelner Proben als auch großer Probenmengen mit minimalem Materialaufwand. Da die hohe Sensitivität der qPCR methodenbedingt mit einer begrenzten Genauigkeit im Bereich des gemischten Chimärismus verbunden ist, wird empfohlen, Proben mit gemischtem Chimärismus mittels des Mentype[®] **DIPscreen** Kits zu analysieren (Leitlinie zur allogenen Stammzelltransplantation der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation (DAG-KBT); Bader *et al.* 2016).

3. Produktbeschreibung Mentype[®] DIPquant

Mit den allelspezifischen Mentype[®] **DIPquant** Singleplex Assays können 55 DIP-Allele sowie zwei Y-chromosomale Regionen individuell adressiert werden (vgl. Tabelle 1). Als Referenz (REF) für die relative Quantifizierung dient das β -Globin-Gen. Die qPCR Parameter sind universell eingestellt, so dass die Analyse verschiedener empfängerspezifischer Mentype[®] **DIPquant** Assays und mehrerer Patientenproben parallel in einem qPCR-Lauf erfolgen kann.

Die Berechnung des Chimärismus erfolgt nach der $\Delta\Delta C_p$ Methode [C_p (*crossing point*) der Roche Lightcycler[®] qPCR Instrumente entspricht dem Ct-Wert (*cycle threshold*) anderer qPCR Systeme].

Für die relative Quantifizierung des Chimärismus wird daher die zum spezifischen Empfänger-Locus parallel verlaufende Messung des **Referenz-Gens** β -Globin (*house-keeping*) benötigt.

Um die Analyse zu kalibrieren, muss die Empfänger DNA, die vor der Transplantation isoliert wurde (**Kalibrator**), zusammen mit dem Referenz-Assay (β -Globin) und dem jeweiligen empfangerspezifischen qPCR Assays, analysiert werden (vgl. Kapitel 9.1).

3.1 qPCR Instrument

Die Mentype® **DIPquant** Assays wurden auf dem Roche Lightcycler® 480 Instrument II real-time PCR System (Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, CH) verifiziert und validiert.

Die Anwendung der Mentype® **DIPquant** Assays auf anderen qPCR Instrumenten muss durch den Anwender validiert und verifiziert werden.

3.2 Probenotyp

Mentype® **DIPquant** wurden mit aus Citrat-Vollblut isolierter DNA validiert.

Das Produkt Mentype® **DIPquant** ist auf einen DNA-Einsatz von 250 ng je Reaktion validiert. Der Einsatz von größeren DNA Mengen muss vom Anwender validiert werden.

3.3 Sensitivität/Spezifität

3.3.1 Messbereich Chimärismus

Technologiebedingt liegt der optimale Messbereich von Chimärismusproben mit den Mentype® **DIPquant** qPCR Assays zwischen 0 % - 12,5 % gemessenem Empfänger- oder Spender-DNA-Anteil in der Patientenprobe (Mischprobe). In diesem Bereich kann das qPCR Setting, wie in Kapitel 9.2 beschrieben, angewendet werden. Für Proben > 12,5 % gemessenem Empfänger- oder Spender-DNA-Anteil sowie Proben des gemischten Chimärismus wird empfohlen, die Anzahl der Replikate zu erhöhen oder die Anwendung Mentype® **DIPscreen** zu nutzen.

3.3.2 Sensitivität und Spezifität

Das Detektionslimit und die Sensitivität der Mentype® **DIPquant** Assays ist abhängig von der Qualität und Quantität der eingesetzten Template-DNA. In Tabelle 1 ist die Sensitivität der allelspezifischen Mentype® **DIPquant** Marker in DNA-Gemischen aufgezeigt. Die Mischungen wurden mit einer DNA-Menge von 250 ng eingesetzt; die unterschüssige DNA war homozygot für den allelspezifischen Mentype® **DIPquant** Marker.

Der in Tabelle 1 aufgeführte maximalen Cp Wert zeigt den Bereich auf, bis zu dem die Signale des entsprechende Mentype® **DIPquant** Assays spezifisch ausgewertet werden können.

Tabelle 1 Spezifische Detektionslimits der Mentype® DIPquant Assays

Sensitivität und Spezifität der Mentype® DIPquant Assays								
Zelläquivalent DIP Allel/PCR	5		10		20		80	
Konzentration [pg/PCR]	31,5	Max. Cp Wert	63	Max. Cp Wert	126	Max. Cp Wert	500	Max. Cp Wert
Anteil in 250 ng/PCR [%]	0,013		0,025		0,05		0,2	
Mentype® DIPquant Assay HLD	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. Warnungen und Sicherheitshinweise

Folgende potenziell gefährliche Stoff ist in diesem Testkit enthalten:

Tabelle 2 Potentiell gefährliche Bestandteile der Mentype® **DIPquant** Kits

Kitkomponente	Chemikalie	Gefahr
Reaktionsmix D	Natriumazid NaN_3	Giftig beim Verschlucken, entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase

Bitte beachten Sie die Sicherheitsdatenblätter (MSDS) der Biotype® Produkte, die wir Ihnen gerne auf Nachfrage zusenden (support@biotype.de). Für Sicherheitsdatenblätter von Reagenzien, die nicht im Testkit enthalten sind, kontaktieren Sie bitte den jeweiligen Hersteller.

Lesen Sie die Gebrauchsanweisung sorgfältig durch, bevor Sie das Produkt anwenden.

Prüfen Sie nach Erhalt das Produkt und seine Komponenten auf Vollständigkeit in Bezug auf Anzahl, Typ und Abfüllung (siehe Kapitel 5.1), richtige Kennzeichnung, gefrorenen Zustand der Reagenzien und Unversehrtheit der Reagenzienverpackungen.

Tragen Sie bei Benutzung der Assays Handschuhe, einen Laborkittel sowie ggf. einen Augenschutz.

Vermeiden Sie Nuklease (DNase / RNase) Kontamination der Proben durch Verwendung von DNase / RNase-freie Einwegpipettenspitzen mit aerosol absorbierenden Filtern.

Verwenden Sie getrennte Arbeitsbereiche für Probenvorbereitung (prä-PCR), Mastermixpräparation sowie Probennachbereitung und Analyse (post-PCR). Lagern Sie die Positivkontrollen räumlich getrennt von den Kit-Komponenten.

Zusätzliche Kontrollen können nach den Richtlinien oder Anforderungen der lokalen, staatlichen und / oder föderalen Vorschriften oder Akkreditierungsorganisationen notwendig sein.

Verwenden Sie keine Komponenten des Kits, die ihr Verfallsdatum überschritten haben und mischen Sie keine Chargen.

Verwerfen Sie Proben- und Testabfälle gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen.

4.1 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 per Mail an info@biotype.de in allen Fragen zur Qualitätssicherung.

5. Mitgelieferte Materialien

5.1 Kit Inhalt

Die Mentype® DIPquant Kits enthalten die folgenden Komponenten ausreichend für die Durchführung von bis zu 100 Reaktionen.

Tabelle 3 Packungsgrößen und enthaltene Komponenten der Mentype® DIPquant Kits, * nur als Mentype® DIPquant Reference Assay erhältlich

Kit-Komponente / Reagent	Volumen pro Packungsgröße		
	25 Rkt	50 Rkt.	100 Rkt*
Nuklease-freies Wasser / Nuclease-free water	1,5 ml	2 x 1,5 ml	2 x 1,5 ml
Reaction Mix D	125 µl	2 x 125 µl	1 x 500 µl
Mentype® DIPquant HLDxxx-D/-I Primer Mix	63 µl	2 x 63 µl	1 x 250 µl
Multi Taq2 DNA Polymerase	10 µl	2 x 10 µl	1 x 40 µl

5.2 Bestellinformation

Richten Sie Ihre schriftliche Bestellung bitte per Mail an sales@biotype.de. Die Bestellung muss die Bestellnummern entsprechend der Tabelle 4 und Tabelle 14, Seite 21, enthalten.

Tabelle 4 Allgemeine Form der Bestellnummern der Mentype® DIPquant Assays, * xx definiert die Bestellnummer des lokus-spezifischen Mentype® DIPquant Assay

Produktname	Packungsgröße	Best. Nr.
Mentype® DIPquant	25 Reaktionen	45-015xx* -0025 (*vgl. Tabelle 14)
Mentype® DIPquant	50 Reaktionen	45-015xx* -0050 (*vgl. Tabelle 14)
Mentype® DIPquant Referenz Assay	100 Reaktionen	45-01591-0100

5.3 Benötigte Reagenzien und Geräte, die nicht im Kit enthalten sind

Zur Auswahl informativer donor- und patientenspezifischer Mentype® DIPquant Assays in einer Multiplex-PCR steht das folgende Kit zur Verfügung:

Tabelle 5 Bestellinformation des Genotypisierungskits Mentype® DIPscreen, * yyy definiert die Packungsgröße

Reagenz	Lieferant	Bestellnummer
Mentype® DIPscreen (Genotypisierung)	Biotype GmbH	45-45410-0yyy*

Hinweis: Die Primer-Bindungsstellen der Mentype® **DIPquant** Assays unterscheiden sich von denen des Kits Mentype® **DIPscreen**. In seltenen Fällen können Mutationen, die in den Primerbindungsstellen auftreten, allelische Aussetzer (*allelic dropouts*) erzeugen. Aufgrund dieser Tatsache können Genotypisierungsunterschiede zwischen Mentype® **DIPquant** Assays und Mentype® **DIPscreen** auftreten. Daher sollten die Mentype® **DIPscreen**-Ergebnisse immer durch die vorausgewählten informativen Mentype® **DIPquant**-Assays verifiziert werden, bevor diese im Chimärismus-Monitoring verwendet werden (siehe auch Kapitel 9.1).

Für die qPCR-Amplifikation werden folgende Materialien und Instrumente benötigt:

- Geeignetes real-time PCR-Instrument (vgl. Kapitel 3.1)
- Geeignetes DNA-Isolations-Kit (vgl. Kapitel 7.2.1)
- Geeignetes Instrument zur quantitativen Vermessung der DNA-Konzentration nach Isolation und Aufreinigung (vgl. Kapitel 7.2.1)
- Tischzentrifuge mit einem Rotor für 2 ml Reaktionsgefäße
- 96-Well-Reaktionsplatten oder Reaktionsröhrchen, bei Nutzung von 96-Well-Reaktionsplatten geeignete Deckel oder Folien, eine Zentrifuge mit Rotor für Mikroliterplatten
- Vortex-Mixer, geeignet für 96-Well-Reaktionsplatten oder Reaktionsröhrchen
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern (Einweg)
- Puderfreie Einweghandschuhe

Hinweis: Stellen Sie sicher, dass alle Geräte nach den Herstellervorgaben installiert, gewartet und kalibriert sind. Vergewissern Sie sich, dass alle Reagenzien zum Betreiben des jeweiligen qPCR Instruments vorhanden sind (siehe Gebrauchsanweisung des jeweiligen Geräteherstellers).

6. Lagerung

Die Versendung der Mentype® **DIPquant** Assays erfolgt auf Trockeneis. Die Bestandteile der Assays treffen gefroren ein. Sollten eine oder mehrere Komponenten nach dem Empfang nicht eingefroren sein oder wurden die Tubes während des Transports beschädigt, wenden Sie sich für weitere Unterstützung an die Biotype GmbH (support@biotype.de).

Die Lagerung der Komponenten muss bei -25 °C bis -15 °C erfolgen. Häufiges Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden. Die maximale Anzahl von 8 Tau-Frier-Zyklen darf nicht überschritten werden.

Die Mentype® **DIPquant** Kits müssen lichtgeschützt aufbewahrt werden.

Die Haltbarkeit des Testkits ist auf dem Verpackungsetikett angegeben.

7. Arbeitsablauf

7.1 Überblick der Chimärismusanalyse mit Mentype®DIP-Produkten

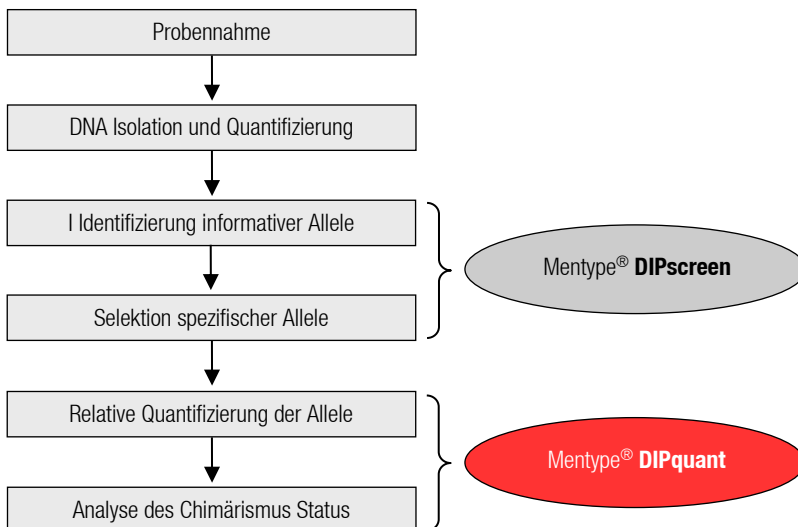


Abbildung 1 Von der Probenahme zur Analyse - die Chimärismusanalyse mit den Anwendungen Mentype® DIPscreen und Mentype® DIPquant

7.2 Probenvorbereitung und DNA-Einsatzvolumen

7.2.1 DNA Isolation

Die Qualität der isolierten DNA hat entscheidenden Einfluss auf die Leistung und Qualität des gesamten Testsystems. Es muss sichergestellt werden, dass das für DNA-Isolation verwendete System mit der qPCR-Technologie kompatibel ist.

Die folgenden Kits eignen sich zur DNA-Isolation:

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

Alternative DNA-Isolations-Kits können ebenfalls angewendet werden, jedoch muss deren Eignung durch den Anwender validiert werden.

Hinweis: Für akkurate Ergebnisse ist die DNA Quantifizierung erforderlich (z. B. durch UV/VIS-spektroskopische DNA-Quantifizierung bei A260 nm und Qualitätsbestimmung mittels A260 / A280 Verhältnis, welches zwischen 1,7 und 2,0 liegen sollte).

7.2.2 Einsatz Template-DNA

Das allelspezifische Primergemisch ist für den Einsatz von 250 ng aufgereinigter DNA optimiert, was 41.666 Zellen (6 pg DNA / Zelle) entspricht. Für optimale Ergebnisse wird der Einsatz von 250 ng DNA empfohlen.

7.3 Ansetzen des Mastermixes

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

Das Volumen der einzusetzenden DNA richtet sich nach ihrer Konzentration. Die DNA-Menge sollte für optimale Ergebnisse auf 250 ng pro Reaktion eingestellt werden.

Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes sollte immer 25 µl betragen.

Berücksichtigen Sie bei der Anzahl der anzusetzenden qPCR-Reaktionen die Positiv- und Negativkontrolle. Fügen Sie der Gesamtanzahl ein oder zwei Reaktionen hinzu, um Pipettierfehler zu kompensieren.

Die folgende Übersicht zeigt die Volumina der eingesetzten Kitbestandteile mit 5,0 µl Probenvolumen (Template-DNA) und einem Reaktionsvolumen von 25 µl.

Tabelle 6 Mastermix-Ansatz für eine Reaktion Mentype® **DIPquant** bei Nutzung von 5 µl DNA

Komponente	Volumen pro qPCR Ansatz
Nuklease-freies Wasser	12,1 µl
Reaction Mix D*	5,0 µl
Mentype® DIPquant HLDxxx-D/-I Primer Mix	2,5 µl
Multi Taq2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µl
Gesamtvolumen des Mastermixes	20,0 µl
Template DNA (50 ng/µl)	5,0 µl

* enthält Mg²⁺, dNTPs, BSA

Hinweis: Lagern Sie die verdünnte DNA in 1 x TE (10 mM Tris HCl, pH 8,0 und 1 mM EDTA) oder 0,1 x TE oder nuklease-freiem Wasser.

7.3.1 Positivkontrolle

Für die Positivkontrolle verwenden Sie anstatt Template-DNA 5 µl z. B. einer vortypisierten, allel-spezifisch positiven Kontroll-DNA (5 ng/µl). Pipettieren Sie die Kontroll-DNA anstelle der Template-DNA in die Reaktionsgefäße mit dem vorgelegten qPCR Mastermix.

Die folgende Übersicht zeigt die Volumina der eingesetzten Kitbestandteile mit 5,0 µl Kontroll-DNA und einem Reaktionsvolumen von 25 µl.

Tabelle 7 Mastermix-Ansatz für eine Reaktion Mentype® **DIPquant** unter Nutzung von 5 ng/µl Positivkontroll Probe

Komponente	Volumen pro qPCR Ansatz
Nuklease-freies Wasser	12,1 µl
Reaction Mix D*	5,0 µl
Mentype® DIPquant HLDxxx-D/-I Primer Mix	2,5 µl
Multi Taq2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µl
Gesamtvolumen des Mastermixes	20,0 µl
Kontroll-DNA (2 ng/µl)	5,0 µl

* enthält Mg²⁺, dNTPs, BSA

7.3.2 Negativkontrolle

Als Negativkontrolle pipettieren Sie 5 µl Nuklease-freies Wasser anstelle der Template-DNA in die Reaktionsgefäße mit dem vorgelegten qPCR Mastermix.

Die folgende Übersicht zeigt die Volumina der eingesetzten Kitbestandteile mit 5,0 µl „Nuklease-freies Wasser“ und einem Reaktionsvolumen von 25 µl.

Tabelle 8 Mastermix-Ansatz der Negativkontrolle für eine Reaktion Mentype® **DIPquant**

Komponente	Volumen pro qPCR Ansatz
Nuklease-freies Wasser	12,1 µl
Reaction Mix D*	5,0 µl
Mentype® DIPquant HLDxxx-D/-I Primer Mix	2,5 µl
Multi Taq2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µl
Gesamtvolumen des Mastermixes	20,0 µl
„Nuklease-freies Wasser“	5,0 µl

* enthält Mg²⁺, dNTPs, BSA

7.4 Reaktionsansatzvolumen

Pipettieren Sie 20 µl des qPCR Mastermixes in die Reaktionsgefäße (optical tubes) oder in die Multiwellplatte (optical multi-well). Fügen Sie dann 5 µl der spezifischen DNA (vgl. Pipettierschema in Kapitel 9.1 und 9.2), oder 5 µl Positiv bzw. Negativ Kontrolle dazu.

Wenn möglich sollten weiße PCR-Platten oder Reaktionsgefäße für das qPCR Instrument verwendet werden, da hierdurch eine effiziente Detektion der Fluoreszenzsignale erreicht wird. Durch die verbesserte Detektion der Fluoreszenz kann die Sensitivität des Assays gesteigert werden.

Nach dem Pipettieren sollten die Reaktionsgefäße bzw. die Multiwellplatten verschlossen werden (optical caps, optical sealings).

Zentrifugieren Sie die Reaktionsansätze kurz und geben Sie diese anschließend zur Analyse in das Gerät.

8. qPCR Programm und Amplifikation

8.1 Geräteeinstellungen und Amplifikationsparameter

Erstellen Sie mit den unten aufgeführten Parametern das Protokoll für die qPCR Amplifikation und Detektion. Gerätespezifische Einstellungen entnehmen Sie bitte dem Handbuch der jeweiligen Gerätehersteller oder kontaktieren Sie unseren technischen Support (support@biotype.de).

8.2 Detektionsparameter

6-FAM dient als Reporter-Fluoreszenzfarbstoff für alle Assays. Achten Sie auf die Auswahl des richtigen Filtersets in der Software des real-time PCR-Gerätes.

8.3 qPCR Amplifikationsparameter*

Um die Multi Taq2 DNA Polymerase zu aktivieren und die Bildung von unspezifischen Amplifikationsprodukten zu unterdrücken, sollte unbedingt ein „hot start“ durchgeführt werden.

Tabelle 9 qPCR Amplifikationsparameter zur Durchführung der Mehtype® **DIPquant** Assays

Temperatur	Zeit	
94 °C	4 min	(hot start um die Multi Taq2 DNA Polymerase zu aktivieren)
94 °C	30 s	45 Zyklen
62 °C	45 s	

* Validiert mit Roche Light Cycler® LC480 (mit Standard Heizraten von ca. 4,4 °C/s und Kühlraten von 2,2 °C/s).

Die Datenaufnahme sollte während der Annealing- und Elongationsphase bei 62 °C erfolgen. Erstellen Sie eine Probenliste (Sample-Sheet) mit den gewählten Einstellungen.

9. Empfohlenes Analyse-Setup

Um den optimalen Messbereich der qPCR zu adressieren, sollte der Empfänger-Anteil in der Mischprobe gemessen werden (vgl. Kapitel 3.3.1)

Für die relative Quantifizierung des Chimärismus wird das Ansetzen der qPCR Assays nach folgendem Schema empfohlen:

- **3** verschiedene **empfängerspezifische Allele** (Allele of Interest, AOI) in **Duplikaten** (siehe Tabelle 10), **oder**
- **2** verschiedene **empfängerspezifische Allele** (Allele of Interest, AOI) in **Triplikaten** (siehe Tabelle 11)
- Pro DNA und Zeitpunkt muss die **Aktive Referenz** (REF, β -Globin) in mindestens **Duplikaten** (besser in Triplikaten) mitgeführt werden
- pro Assay eine **negative (NTC)** und **positive Kontrolle (PC)**

Tabelle 10 Set-up 1: Nutzung von 3 spezifischen Mentype® **DIPquant** in Duplikaten und des Mentype® **DIPquant** Reference Assays in Triplikaten

Assay	Replikate	Anzahl der untersuchten Loci
Spezifisches DIPquant Assays	2	3
Referenz-Assay (β -Globin)	3	-

Tabelle 11 Set-up 2: Nutzung von 2 spezifischen Mentype® **DIPquant** in Triplikaten und des Mentype® **DIPquant** Reference Assays in Triplikaten

Assay	Replikate	Anzahl der untersuchten Loci
Spezifisches DIPquant Assays	3	2
Referenz-Assay (β -Globin)	3	-

9.1 Quantifizierung vor der Transplantation (pre-HSCT)

Die Empfänger DNA vor der Transplantation (pre-HSCT Kalibrator) muss zusammen mit dem Referenz-Assay (β -Globin Gen) und den jeweiligen empfängerspezifischen qPCR Assays analysiert werden, um die Analyse zu kalibrieren. Der Wert dieser Quantifizierung wird als 100 % Empfänger-Anteil festgelegt.

Um die Spezifität der empfängerspezifischen qPCR Assays abzusichern, sollte eine Analyse der Spender DNA durchgeführt werden. Dies entspricht dem 0 % Empfänger-Anteil.

Tabelle 12 Beispiel für das Setup einer Multiwell Platte vor Transplantation (Kalibrator)

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

Ref: Referenz Assay; AOI 1-3: Empfänger-spezifisches Assay; preTx: Empfängerprobe als Kalibrator; Spender*: Optionale Spenderprobe als Spezifitätstest; NTC: No Template Control; PC: Positive Control

9.2 Quantifizierung nach Transplantation / Monitoring (post-HSCT)

Das Chimärismus-Monitoring sollte mit Patienten DNA erfolgen, die frisch zu den jeweiligen Monitoring-Zeitpunkten isoliert wurde. Für eine sichere Analyse sollte die Referenz, drei empfängerspezifische Allele, sowie Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt werden (vgl. unten).

Tabelle 13 Beispiel für das Setup einer Multiwell Platte nach Transplantation (Monitoring)

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

Ref: Referenz Assay; AOI 1-3: Empfänger-spezifisches Assays; Monitoring 1: Erste Monitoringprobe nach Transplantation; NTC: No Template Control; PC: Positive Control;

10. Auswertung

10.1 Datenanalyse

Betrachten Sie die Amplifikationskurven des gesamten qPCR Laufes. Der detaillierte Ablauf der Rohdatenanalyse ist vom verwendeten Real-Time Gerät abhängig.

Die Definition des Schwellenwertes „baseline noise levels“ sollte entweder automatisch erfolgen, oder auf bestimmte Zyklen vordefiniert werden (z. B. 3-15). Verwenden Sie die **NTC** um den jeweiligen Schwellenwert zu ermitteln.

Da die **ΔΔCp** Methode zur Quantifizierung eingesetzt wird, haben individuell für den Schwellenwert gesetzte Werte keinen Einfluss auf die Ergebnisse solange alle Assays einer Probe mit dem gleichen Schwellenwert analysiert werden.

Informationen für den Datenexport sowie die Datenverarbeitung entnehmen Sie bitte dem Handbuch Ihres Real-Time Geräteherstellers. Exportieren Sie den Probennamen „Sample name“ und die Cp Werte für die anschließenden Berechnungen.

10.2 Prüfen der Ergebnisse

Die qPCR war erfolgreich, wenn die Cp Werte der positiven Kontrolle den Werten in Tabelle 1 entsprechend auswertbar sind und die negative Kontrolle keine Amplifikation < 45 Zyklen aufweist.

Unter Verwendung von Spender DNA zur Kontrolle der Assayspezifität sollten keine Signale unterhalb der Grenzwerte aus Tabelle 1 detektierbar sein.

11. Quantifizierung

Sollten Sie die Daten manuell auswerten, wenden Sie bitte die Methode der relativen Quantifizierung an. Individuell gesetzte Schwellenwerte während der Rohdatenanalyse haben keinen Einfluss auf die Quantifizierung mittels der $\Delta\Delta C_p$ Methode, solange alle Assays einer Probe mit dem gleichen Schwellenwert analysiert werden.

Verwenden Sie die **NTC**, um die entsprechenden Schwellenwerte zu ermitteln.

Berechnung

11.1 Quantifizierung der prä-HSCT Proben

1. Berechnen Sie die individuellen C_p Werte für die Referenz (REF) und die informativen Allele „Alleles of Interest“ (AOI) für die Empfänger DNA
2. Berechnen Sie den ΔC_p für jede AOI zur REF ($\Delta C_p C = C_p \text{ AOI} - C_p \text{ REF}$)
3. ΔC_p ergibt den Wert des Kalibrators ($\Delta C_p C$) in der post-HSCT Berechnung (100 % Empfänger)

11.2 Quantifizierung der Post-HSCT Proben

1. Berechnen Sie die individuellen C_p Werte für die Referenz (REF) und die informativen Allele „Alleles of Interest“ (AOI) für die Patienten DNA
2. Berechnen Sie ΔC_p für jedes AOI zur REF ($\Delta C_p C = C_p \text{ AOI} - C_p \text{ REF}$)
3. Dieser ΔC_p Wert wird für die Berechnung des unbekanntes Status ($\Delta C_p U$) verwendet
4. Berechnen Sie $\Delta\Delta C_p$ für die Quantifizierung des Chimärismus ($\Delta\Delta C_p = \Delta C_p U - \Delta C_p C$)
5. Berechnen Sie die % der Empfänger-Komponente in Abhängigkeit von der Effizienz der qPCR; % Empfänger = $((1+E)^{-\Delta\Delta C_p}) \times 100$. Ist die qPCR Effizienz 100 % verwenden sie die folgende Formel: $(2^{-\Delta\Delta C_p}) \times 100$.

12. Interpretation ungewöhnlicher Ergebnisse

12.1 Geringe Signalstärke oder kein Signal detektiert

Ein oder mehrere Komponenten wurden dem Reaktionsansatz nicht beigelegt: Überprüfen Sie die Amplifikation der Positivkontrolle und wiederholen Sie ggf. die qPCR.

Zur Analyse wurde das falsche Assay verwendet: Vergewissern Sie sich, dass die allelspezifischen Assays mit den empfangerspezifischen Allelen kompatibel sind.

Suboptimale qPCR Bedingungen: Überprüfen Sie die qPCR Einstellungen. Stellen Sie sicher, dass die Aktivierung der Multi Taq2 DNA Polymerase bei 94 °C für 4 min erfolgt ist. Überprüfen Sie die Annealing- sowie die Elongationstemperatur und stellen Sie sicher, dass die Heizrate des Gerätes auf 4 °C/s und die Kühlrate des Gerätes auf 2 °C/s gesetzt ist.

Die qPCR wurde inhibiert: Aus der DNA-Extraktion wurden PCR-Inhibitoren nicht vollständig abgereinigt. Stellen Sie daher sicher, dass die DNA-Reinigung sorgfältig nach Anweisung des Kitherstellers erfolgt ist. Reinigen Sie die DNA erneut oder verdünnen Sie das Template. Wiederholen Sie die qPCR mit der aufgereinigten bzw. verdünnten DNA.

Die Daten Sammlung ist fehlgeschlagen: Vergewissern Sie sich, dass die Fluoreszenz-Datensammlung zum richtigen Zeitpunkt im richtigen Fluoreszenzkanal erfolgte. Überprüfen Sie die Einstellungen Ihres Gerätes im Hinblick auf die im Assay verwendete Fluoreszenzfarbe (6-FAM und ROX).

Probleme der Basislinie oder des Schwellenwertes: Setzen Sie den Schwellenwert oberhalb des unspezifischen Backgrounds, um akkurate Cp-Werte zu erhalten. Verwenden Sie hierfür, die in dem Handbuch Ihres PCR-Geräteherstellers angeführte Vorgehensweise. Wenn möglich, nehmen Sie die Einstellungen für die Basislinie und den Schwellenwert manuell vor.

Degradierung der Template-DNA: Die Degradierung der DNA kann während der Probenaufarbeitung und während der Lagerung erfolgen. Lagern Sie die DNA in 1x oder 0,1x TE oder Nuklease-freiem Wasser. Verwenden Sie die Kontroll-DNA, um das Gesamtverhalten des Assays zu überprüfen.

Degradierung der qPCR-Komponenten: Überprüfen Sie die Haltbarkeit der eingesetzten Komponenten, sowie die Lagerungsbedingungen. Vermeiden Sie häufiges Einfrieren und Auftauen des Primergemisches > 8 Zyklen und stellen Sie sicher, dass die Lagerung der Komponenten bei -25 °C bis -15 °C erfolgte.

12.2 Schwankungen der Signalstärke innerhalb der Replikate

Pipettierfehler: Sie vermeiden Pipettierfehler durch eine regelmäßige Überprüfung Ihres Pipettensatzes.

Variationen im Master Mix: Fügen Sie beim Ansetzen des Mastermixes 1-2 Reaktionen extra hinzu, um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen. Mischen Sie die Komponenten sorgfältig durch kurzes Vortexen und kurzes Abzentrifugieren (10 s). Pipettieren Sie nicht weniger als 5 µl Template-DNA.

Die qPCR wurde inhibiert: Während der DNA-Isolation wurden PCR-Inhibitoren nicht vollständig abgereinigt. Stellen Sie daher sicher, dass die Aufreinigung bei der DNA-Isolation sorgfältig entsprechend der Angaben des Herstellers erfolgt. Reinigen Sie die DNA erneut oder verdünnen Sie das Template. Wiederholen Sie die qPCR mit der aufgereinigten/verdünnten DNA.

Die Basislinie oder der Schwellenwert wurden falsch gesetzt: Setzen Sie den Schwellenwert oberhalb des unspezifischen Backgrounds, um akkurate C_p -Werte zu erhalten. Verwenden Sie hierfür, die in dem Handbuch Ihres qPCR-Geräteherstellers angeführte Vorgehensweise. Wenn möglich, nehmen Sie die Einstellungen für die Basislinie und den Schwellenwert manuell vor.

Geringe Sensitivität: Der Einsatz von zu geringen DNA Mengen (optimal 250 ng) kann die Sensitivität und Reproduzierbarkeit innerhalb der Replikate herabsetzen. Quantifizieren Sie die genutzte DNA entsprechend der Empfehlung in Kapitel 7.2.1.

Signale in der negativen Kontrolle: Um Kontaminationen auszuschließen, verwenden Sie „aerosoldichte Pipettenspitzen / barrier tips“ oder „screw-cap tubes“. Lassen Sie eine erneute qPCR mit dem eingesetzten Nuklease-freiem Wasser laufen. Lagern Sie prä- und post-PCR Reagenzien getrennt voneinander. Pipettieren Sie den Reaktionsansatz und die DNA wenn möglich in unterschiedlichen Räumlichkeiten.

12.3 Signale der Empfänger-spezifischen Assays in der Donor DNA

Einsatz von zu großen Mengen (> 250 ng) an Template-DNA: Reduzieren Sie die Template-DNA Menge auf 250 ng. Vor Ansetzen der Assays muss die DNA-Konzentration bestimmt werden.

Auftreten falsch negativer Signale: In seltenen Fällen kann es durch Mutation, die in der Primer-Bindungsstellen auftreten, zu allelic-dropouts kommen. Aus der Genotypisierung mit dem Mentype® **DIPscreen** könnten so falsch negative Ergebnissen resultieren (vgl. Kapitel 5.3, 9.1). Da sich die Primer-Bindungsstellen der Mentype® **DIPquant** Assays von denen des Mentype® **DIPscreen** unterscheiden, können in der qPCR dennoch positive, allelspezifische Signale amplifiziert werden.

13. Bestellinformationen

Tabelle 14 Detaillierte Bestellinformationen der allel-spezifischen Mentype® **DIPquant** Assays

DIPquant Assay	25 Reaktionen	50 Reaktionen
Reference*	45-01591-0025	45-01591-0050
SRY	45-01590-0025	45-01590-0050
SMCY	45-01589-0025	45-01589-0050
HLD23-I	45-01538-0025	45-01538-0050
HLD38-I	45-01558-0025	45-01558-0050
HLD48-I	45-01560-0025	45-01560-0050
HLD53-D	45-01561-0025	45-01561-0050
HLD53-I	45-01562-0025	45-01562-0050
HLD67-D	45-01567-0025	45-01567-0050
HLD67-I	45-01568-0025	45-01568-0050
HLD70-D	45-01569-0025	45-01569-0050
HLD70-I	45-01570-0025	45-01570-0050
HLD79-I	45-01576-0025	45-01576-0050
HLD82-D	45-01577-0025	45-01577-0050
HLD82-I	45-01578-0025	45-01578-0050
HLD84-D	45-01579-0025	45-01579-0050
HLD84-I	45-01580-0025	45-01580-0050
HLD88-D	45-01581-0025	45-01581-0050
HLD88-I	45-01582-0025	45-01582-0050
HLD91-D	45-01585-0025	45-01585-0050
HLD91-I	45-01586-0025	45-01586-0050
HLD97-I	45-01588-0025	45-01588-0050
HLD101-D	45-01501-0025	45-01501-0050
HLD101-I	45-01502-0025	45-01502-0050
HLD103-D	45-01505-0025	45-01505-0050
HLD103-I	45-01506-0025	45-01506-0050
HLD104-D	45-01507-0025	45-01507-0050
HLD104-I	45-01508-0025	45-01508-0050
HLD105-D	45-01509-0025	45-01509-0050
HLD105-I	45-01510-0025	45-01510-0050
HLD106-D	45-01511-0025	45-01511-0050
HLD106-I	45-01512-0025	45-01512-0050
HLD110-I	45-01514-0025	45-01514-0050
HLD112-I	45-01516-0025	45-01516-0050

HLD114-D	45-01517-0025	45-01517-0050
HLD114-I	45-01518-0025	45-01518-0050
HLD116-D	45-01519-0025	45-01519-0050
HLD116-I	45-01520-0025	45-01520-0050
HLD128-D	45-01523-0025	45-01523-0050
HLD128-I	45-01524-0025	45-01524-0050
HLD131-D	45-01525-0025	45-01525-0050
HLD131-I	45-01526-0025	45-01526-0050
HLD133-I	45-01528-0025	45-01528-0050
HLD134-D	45-01529-0025	45-01529-0050
HLD134-I	45-01530-0025	45-01530-0050
HLD140-I	45-01532-0025	45-01532-0050
HLD152-D	45-01533-0025	45-01533-0050
HLD163-D	45-01535-0025	45-01535-0050
HLD163-I	45-01536-0025	45-01536-0050
HLD301-D	45-01539-0025	45-01539-0050
HLD301-I	45-01540-0025	45-01540-0050
HLD304-D	45-01541-0025	45-01541-0050
HLD305-D	45-01543-0025	45-01543-0050
HLD305-I	45-01544-0025	45-01544-0050
HLD307-D	45-01545-0025	45-01545-0050
HLD307-I	45-01546-0025	45-01546-0050
HLD310-D	45-01549-0025	45-01549-0050

* auch in der Packungsgröße 100 Rkt erhältlich (45-01591-0100)

14. Referenzen

- Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, Lamy T, Le Prise PY, Beauplet A, Bories D, Semana G, Quelvennec E, (2002)** Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 99, 4618-4625.
- Bader P, Bornhäuser M, Grigoleit U, Kröger N, (2016)** Leitlinien zur allogenen Stammzelltransplantation (SZT) von der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantationen (DAG-KBT), Kapitel X: Monitoring nach allogener SZT – Chimärismusanalyse und Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) https://www.dag-kbt.de/files/downloads/Leitlinien_Kap-10_Monitoring%20nach%20allogener%20SZT.pdf.
- Chen DP, Tseng CP, Wang WT, Wang MC, Tsai SH, Sun CF (2011)** Real-time biallelic polymorphism-polymerase chain reaction for chimerism monitoring of hematopoietic stem cell transplantation relapsed patients. *Clin Chim Acta* 412, 625-630.
- Harries LW, Wickham CL, Evans JC, Rule SA, Joyner MV, 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. Marken und Haftungsausschluss

In diesem Dokument verwendete eingetragene Namen, Marken usw. sind, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, nicht als ungeschützt anzusehen: Biotype[®], Mentype[®] (Biotype GmbH); LightCycler[®] (Roche Diagnostics International AG); QIAamp[®] (QIAGEN GmbH); NucleoSpin[®] (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG); FAM[™], ROX[™] (Life Technologies Ltd.).

Mentype[®] **DIPscreen** und Mentype[®] **DIPquant** Assays sind CE-gekennzeichnete Kits gemäß der europäischen Richtlinie 98/79 / EG für In-vitro-Diagnostika. Die Kits sind nicht als In-vitro-Diagnostika außerhalb dieses regulatorischen Bereichs erhältlich.

16. Symbole



Hersteller



Gebrauchsanweisung beachten



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostika

Verifizierung und Validierung der Mentype® DIPquant qPCR-Amplifikationskits

A Analytische Leistungsdaten (Verifizierung)

A a) Humane DNA

Für alle Verifizierungsexperimente wurde eine Biobank von mehr als 100 menschlichen DNA-Proben verwendet, die aus venösem EDTA-Blut hergestellt wurden. Die Proben stammten von nicht verwandten gesunden Freiwilligen, die ihre schriftliche Einverständniserklärung gaben. Für Präanalytik, DNA-Isolierung und DNA-Quantifizierung siehe Kapitel B b).

A b) Analytischen Spezifität und Limit of Blank (LoB)

Zielsetzung: Das Produkt besteht aus 57 Assays für autosomale Biallelmarker, zwei Y-chromosomale Marker und das Referenzgen. Die Spezifität der Allel- und Y-chromosomalen spezifischen Mentype® **DIPquant** -Assays muss in Gegenwart eines produktdefinierten Überschusses des alternativen Allels oder X-Chromosoms sichergestellt werden.

Methodik: Echtzeit-qPCR-Daten von Kontrollen ohne Template (NTC, $n \geq 12$), Kontrollen mit 250 ng homozygoter DNA für das alternative Allel oder 250 ng weibliche DNA (im Fall von Y-spezifischen Markern) ($n \geq 9$), welche nicht nachgewiesen werden sollten, wurden für jeden Mentype® **DIPquant** qPCR Assay gesammelt.

Ergebnisse: Alle NTCs zeigten vor 45 Zyklen keine falsch-positiven Signale. Im Fall von 250 ng homogener DNA für das alternative Allel oder die weibliche DNA zeigten 26 Mentype® **DIPquant** qPCR-Assays keine Signale vor 45 Zyklen. Die anderen Tests zeigten unspezifische Signale vor 45 Zyklen. Es wurde jedoch eine stochastische Verteilung zwischen 1 und 6 falsch positiven Ergebnissen innerhalb von 9 parallelen Messungen beobachtet. Daher wurde der nicht-parametrische Analyseansatz verwendet, um den LoB zu berechnen (CSLI 2012, Daten nicht gezeigt).

A c) Analytischen Sensitivität und Limit of Detection (LoD)

Zielsetzung: Experimente wurden durchgeführt, um die analytische Nachweisgrenze (LoD) aller qPCR-Tests zu ermitteln.

Methodik: Die Berechnung, ob die LoD das Qualitätskriterium zum Ausschließen falsch positiver Ergebnisse erfüllt, wurde durch die Gleichung $LoB - (LOD + 2 \times \delta) \geq 2$ berechnet, wobei LoB der Cp-Wert ist, der gemäß A a) nichtparametrisch bestimmt wird; LoD ist der mittlere Cp-Wert von positiven Messungen; und δ ist die Standardabweichung von LoD. DNA-Gemische wurden für alle allelspezifischen Tests unter Verwendung von 250 ng homozygoter DNA für das alternative Allel oder 250 ng weibliche DNA (im Falle von Y-spezifischen Markern) pro PCR und verschiedenen Mengen an homozygoter DNA des nachzuweisenden Allels erzeugt. Die Anzahl der Wiederholungen betrug 6 (3 an zwei verschiedenen Tagen).

Ergebnisse: Zuerst wurden 31,5 pg DNA des nachzuweisenden Allels (entsprechend 0,01% Minor-Allel) der Hintergrund-DNA hinzugefügt. Zusätzliche Experimente mit 63 pg (0,025% geringes Allel), 126 pg (0,05% geringes Allel) bzw. 500 pg (0,2% geringes Allel) wurden in Fällen durchgeführt, in denen das Qualitätsakzeptanzkriterium nicht erreicht wurde. Die Ergebnisse für alle qPCR-Tests sind in Tabelle 1 dargestellt.

A d) **Messbereich der Assays**

Zielsetzung: Der lineare Messbereich der Assays wurde bestimmt.

Methodik: Die Experimente umfassten alle Daten von A b) und A c). Zusätzlich wurden Reihenverdünnungen von rekombinanten Plasmiden, die DNA-Regionen der nachzuweisenden Allele codierten, im Bereich zwischen 5 und 5120 Kopien pro Reaktion gemessen. Insgesamt wurden 11 Verdünnungen einschließlich Kontrollen ohne Template (NTC) hergestellt und die Anzahl der Wiederholungen betrug 6 (3 an zwei verschiedenen Tagen).

Ergebnisse: Ein linearer Messbereich von $24 \leq Cp \leq LOD$ wurde für alle Assays definiert. Ein Cp-Wert von 24 mit 5120 Kopien des Zielalleles entspricht 12,5 % der unterschüssigen DNA in einer Mischung mit insgesamt 250 ng DNA pro Reaktion.

A e) **Testung Chargenschwankungen und Performance am LoD**

Zielsetzung: Die Konzentrationsverhältnisse der Inhaltsstoffe des PCR-Puffers Reaction Mix D der MultiTaq2 Polymerase sind für Sensitivität, Spezifität und Ausgewogenheit der Signale in der qPCR entscheidend. Der Einfluss von Chargenvariationen dieser Kitkomponenten wurde getestet.

Methodik: Vier Chargen von Reaction Mix D und drei Chargen MultiTaq2-DNA-Polymerase wurden getestet. Die Assays Mentype® **DIPquant** HLD53-I, Mentype® **DIPquant** HLD84-I, Mentype® **DIPquant** HLD101-I, Mentype® **DIPquant** HLD70-D und Mentype® **DIPquant** HLD88-D wurden beispielhaft für die Messungen verwendet. Die qPCR wurde unter Standardbedingungen mit Kontroll-DNA (General Positive Control, Biotype GmbH) in zwei verschiedenen DNA-Konzentrationen (50 pg pro PCR-Reaktion und 5 ng pro PCR-Reaktion) durchgeführt. Für jede Konzentration wurden drei parallele Proben durchgeführt. Zusätzlich wurden drei Blindwerte (NTCs) pro DIPquant-Test und pro Batch durchgeführt.

Ergebnisse: Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 sowie Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 15 Variation zwischen vier Chargen an Reaction Mix D

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

Tabelle 16 Variation zwischen drei Chargen an Multi Taq2 DNA Polymerase

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

A f) **Messung an zwei verschiedenen Tagen**

Zielsetzung: Messungen wurden an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt, um den Einfluss des Pipettierens zweier unabhängiger Master Mixe und des Instruments auf die Leistung des Assays zu zeigen.

Methodik: Für die Simulation möglicher Pipettierfehler durch den Benutzer wurden $\pm 10\%$ Volumenschwankungen von PCR-Puffer und MultiTaq2 mit der Standardreaktion bei 3 leistungsstarken und 3 leistungsschwachen qPCR-Assays verglichen. Der qPCR wurde unter Standardbedingungen mit Kontroll-DNA (General Positive Control) mit zwei verschiedenen DNA-Konzentrationen (50 pg pro PCR-Reaktion und 5 ng pro PCR-Reaktion) durchgeführt. Für jede Konzentration wurden drei parallele Proben durchgeführt. Zusätzlich wurden drei Blindwerte (NTCs) pro DIPquant-Assay und pro Charge ermittelt.

Ergebnisse: Mögliche Pipettierfehler bei einer Volumenschwankung von $\pm 10\%$ haben keinen Einfluss auf die Leistung der ausgewählten Mentype® **DIPquant**-Assays mit 5 ng GPC. Das Akzeptanzkriterium wird für alle Assays und für jeden simulierten Pipettierfehler erreicht. Es treten keine Fehler auf und es wurden keine nicht spezifischen Nebenprodukte erkannt.

Bei Verwendung von 50 pg GPC pro Reaktion sind breitere Variationen > 2 Cp möglich. Daher ist die Verwendung von kalibrierten Geräten wie Pipetten verpflichtend.

A g) Haltbarkeit nach Anbruch

Zielsetzung: Die Stabilität der Reagenzien des qPCR-Kits wurde nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen getestet. Damit wird die tatsächliche Routineverwendung des Produkts in einem simulierten (beschleunigten) Verfahren nachgeahmt.

Methodik: Exemplarisch wurden vier Mentype® **DIPquant** Assays ausgewählt. Die Primer-Sonden Gemische wurden einem 8-fachen Einfrier- und Auftauzyklus unterworfen. Das Einfrieren wurde mindestens für 30 Minuten bei -20 °C durchgeführt. Aufgetaut wurde bei Raumtemperatur und die Reagenzien wurden vor Gebrauch durch Schütteln homogenisiert. Anschließend wurde eine Standardreaktion durchgeführt. Damit ein zusätzlicher Einfluss durch die Verwendung verschiedener DNAs vermieden werden konnte, wurde die Kontroll-DNA (GPC) als Template eingesetzt. Für die Testung wurden zwei verschiedene DNA Konzentrationen ausgewählt (50 pg pro PCR Reaktion und 5 ng pro PCR Reaktion). Für jede Konzentration wurden drei Parallelproben durchgeführt. Darüber hinaus wurden pro Mentype® **DIPquant** Assay drei NTCs mitgeführt.

Ergebnisse: Häufiges Einfrieren und Auftauen hat keinen negativen Einfluss auf die Performance der DIPquant Assays. Die Detektion mithilfe des Primer-Sonden Gemisches ist auch nach 8-fachen Einfrier- und Auftauzyklus möglich. Die Cp-Werte verändern sich minimal. Die Abweichung liegt im Bereich der Geräteschwankung des qPCR Cyclers.

B Klinische Leistungsdaten

B a) Ethische und regulatorische Aspekte

Es wurde eine Leistungsbewertungsprüfung gemäß Artikel §§ 20 - 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. Das Protokoll wurde von der lokalen Ethikkommission eines klinischen Studienzentrums genehmigt. Alle Teilnehmer waren Erwachsene, sui juris, und gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung ab.

B b) Präanalytik, DNA-Isolation und DNA-Quantifizierung

Venöse EDTA-Blutproben wurden verwendet (z. B. S-Monovette K2E, Sarstedt AG & Co. KG, Nuembrecht, DE). Die DNA-Isolierung aus Vollblut wurde mit dem QIAamp® DNA-Blut-Mini-Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die DNA-Konzentrationen wurden mittels Ultraviolett-sichtbar-Absorptionsspektroskopie bei 260 nm bestimmt.

B c) Konkordanzanalyse

Alle Patienten erhielten eine gemischt-geschlechtliche, allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation, die Genotypisierung wurde durch Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) unter Verwendung des gonosomenspezifischen CE-IVD CEP® X SpectrumOrange / Y SpectrumGreen™ -Direktmarkierten Fluoreszenz-DNA-Sondenkits (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, DE) durchzuführen. Die PCR-basierte Chimärismusanalyse wurde mit Mentype® **DIPquant** (qPCR), Mentype® **DIPscreen** (Biotype GmbH), einer Multiplex-PCR in Kombination mit Kapillarelektrophorese unter Verwendung eines ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, US-CA); sowie Mentype® **Chimera**® (Biotype GmbH), einer Multiplex-PCR kombiniert mit Kapillarelektrophorese unter Verwendung eines ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer durchgeführt. Bei Verwendung des Kits Mentype® **DIPquant** wurden 250 ng DNA pro Reaktion aufgebracht. Alle Kits wurden gemäß den Gebrauchsanweisungen der Hersteller verwendet.

B d) Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wurden alle informativen STR- und DIP-Systeme der Spender-Empfänger-Paare bestimmt. Darüber hinaus wurde das Geschlecht durch Genotypisierung mit dem Amelogenin-Marker bestätigt, der ebenfalls Bestandteil von Mentype® **DIPscreen** und Mentype® **Chimera**® ist. Insgesamt wurden 54 ETDA-Blutproben von 6 Patienten an verschiedenen Tagen nach Blutstammzelltransplantation entnommen. Der Mittelwert aller informativen STR- und DIP-Biomarker (2-7) wurde für die Chimärismusanalyse bei Multiplex-PCR-Genotypisierung in Kombination mit Kapillarelektrophorese verwendet. Im Falle der Mentype® **DIPquant** Analyse wurden drei informative qPCR-Assays und das Referenzgen gemäß Kapitel 10.2 der Gebrauchsanweisung ausgewählt und in Duplikaten analysiert. Im Allgemeinen wurde das im geringeren Anteil vorhandene Allel bestimmt.

Die Ergebnisse der Vergleichsmessung sind in Abbildung 2 bis Abbildung 4 bis aufgezeigt.

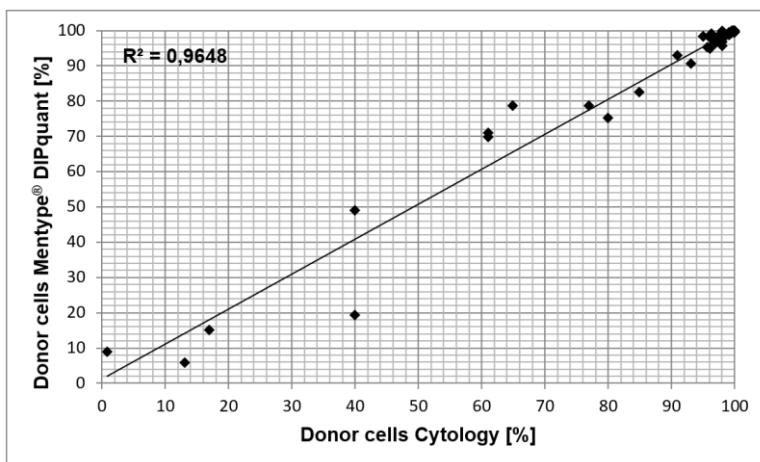


Abbildung 2 Vergleich der Mentype® **DIPquant** Assays mit Zytologie in der Chimärismusanalyse

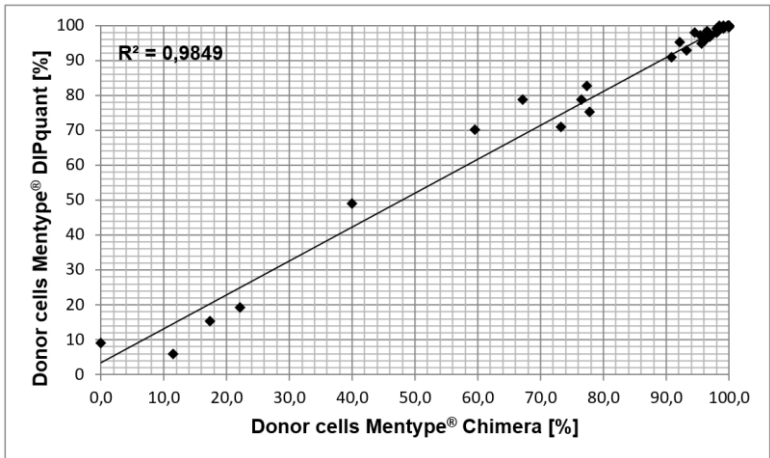


Abbildung 3 Vergleich der Mentype® DIPquant Assays und Mentype® Chimera® in der Chimärismusanalyse

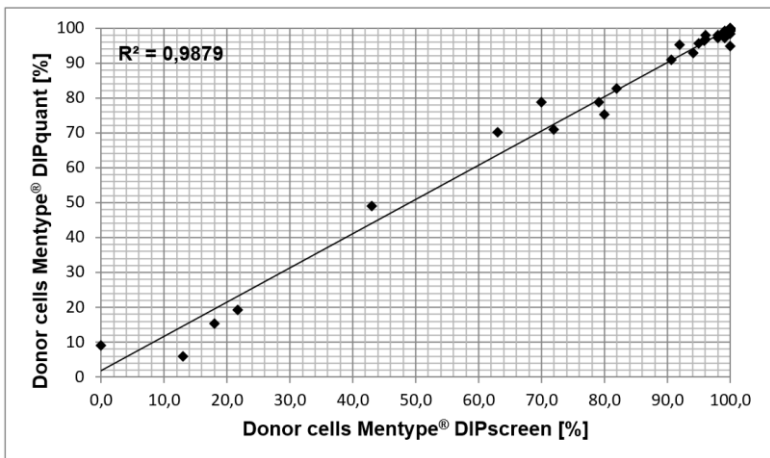


Abbildung 4 Vergleich der Mentype® DIPquant Assays mit Mentype® DIPscreen in der Chimärismusanalyse

Das Bestimmtheitsmaß (Quadrat im Quadrat) von Mentype® **DIPquant** im Vergleich zu FISH, Mentype® **Chimera**® und Mentype® **DIPscreen** betrug 0,9648, 0,9849 bzw. 0,9879. Die beste Übereinstimmung wurde mit Mentype® **DIPscreen** erzielt, das die gleichen Biomarker besitzt: Eine geringere Übereinstimmung von FISH spiegelt technische Unterschiede wider. Mindestens 200 Zellen sollten gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers gezählt werden. Bessere Ergebnisse werden jedoch mit mehr als 500 Zellzahlen erzielt (Buño et al. 2005): Dies wurde nicht bei allen Proben erzielt.

Die wissenschaftliche Validität aller getesteten Biomarker für die Chimärismusanalyse wurde häufig in der Literatur gezeigt (Thiede et al. 2001; Thiede und Lion 2001; Wilhelm et al. 2002; Buño et al. 2005). PCR-basierte Tests werden bereits in klinische Leitlinien akzeptiert (Bader et al. 2016). Zunächst wurde FISH als Vergleichstest verwendet. Diese Technik besitzt nach wie vor einen lokalen Wert bei Transplantationen, bei denen die Geschlechter nicht übereinstimmen. Es zeigt jedoch nur eine Sensitivität von 1% für die kleinere Zellpopulation. Multiplex-PCR, die auf kurzen Tandem-Repeats (STR) basiert, wie Mentype® **Chimera**®, wird häufig als goldener Standard der Chimärismusanalyse bezeichnet (Bader et al. 2016). Biallelische Marker wie DIPs bieten technische Vorteile wie keine stotternden Peaks bei der Kapillarelektrophorese oder ihre Eignung für qPCR, die Empfindlichkeiten von weniger als 0,1% erreichen können (Wilhelm et al. 2002; Bader et al. 2016).

B e) Referenzen

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

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

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

Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, Mohr B, Florek M, Kroschinsky F, Geissler G, Naumann R, Ritter M, Prange-Krex G, Lion T, Neubauer A, Ehninger G. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (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

www.biotype.de