

# Mentype<sup>®</sup> DIPscreen

## Gebrauchsanweisung

**Der erste Schritt zur Quantifizierung von  
Chimärismusproben**

In-vitro-Diagnostikum



DISIFU01v6de

April 2021

45-45410-0025

45-45410-0100

45-45410-0400



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

## Produkt Beschreibung

Mentype® **DIPscreen** ist eine Multiplex-PCR Anwendung für die Identifizierung von informativen DIP-Loci zur Spender / Empfänger Differenzierung nach allogener Stammzelltransplantation. Eine Screening-Reaktion dieser Anwendung erfasst den Allelzustand von insgesamt 33 biallelischen DIP-Loci sowie des geschlechtsspezifischen Markers Amelogenin.

Die Analyse des molekularen Chimärismus ist entscheidend, um das Anwachsen des Stammzelltransplantates zu überwachen bzw. um eine drohende Abstoßungsreaktion frühzeitig zu erkennen. Die molekulare Chimärismusanalyse kann über diverse DNA-Sequenzmotive erfolgen. Großen Vorteil bieten hier die sogenannten Insertions/Deletions DNA-Polymorphismen (DIPs/INDELs). Im Vergleich zu anderen DNA-Sequenzmotiven führt die enzymkatalysierte Amplifikation dieser Loci nicht zur Ausbildung von „stutter-peak“ Artefakten, außerdem eignen sich DIP-Polymorphismen sehr gut für die quantitative Analyse mittels qPCR Technologie. Eine auf DIPs basierte Diagnostik kann somit der eindeutigen und hoch quantitativen Überwachung des Chimärismusstatus gerecht werden.

Die 33 untersuchten DIP loci liegen in einem Abstand von mindestens 10 Mbp zueinander und sind dabei über 18 Chromosomen verteilt (Tabelle 1). Die Nachweisgrenze des Mentype® **DIPscreen** liegt bei **200 pg genomischer DNA**. Der optimale Bereich für die Analyse unter Standardbedingungen liegt zwischen **1,0 und 2,0 ng DNA**. Die Primer sind mit den Fluoreszenzfarbstoffen **6-FAM, BTG, und BTY** markiert.

Die Validierung und Evaluierung des Assays erfolgte auf den Geräten GeneAmp® 9700 Silber (Max. Mode), Eppendorf Mastercycler ep-S, Biometra T1, ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer unter Verwendung von 36 cm Kapillaren und POP4® Polymer.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Beschreibung des Mentype® DIPscreen .....</b>	<b>5</b>
<b>2. PCR Amplifikation .....</b>	<b>9</b>
2.1 Ansetzen des Master Mixes .....	9
2.2 PCR Amplifikationsparameter .....	10
<b>3. Kapillargelelektrophorese .....</b>	<b>11</b>
3.1 Vorbereitung der PCR-Produkte .....	11
3.2 Fragmentlängenanalyse.....	11
<b>4. Auswertung .....</b>	<b>13</b>
4.1 Biotype® Auswertevorlagen .....	14
4.2 Kontrollen .....	15
4.3 Fragmentlängen und Allele .....	16
<b>5. Interpretation der Ergebnisse.....</b>	<b>21</b>
<b>6. Referenzen .....</b>	<b>22</b>
<b>7. Erklärung der Symbole .....</b>	<b>23</b>
<b>A Analytische Validierung.....</b>	<b>24</b>
A a) Festlegung der Standardreaktion und chargenspezifischer Toleranzen .....	24
A b) Testung der Genotypisierungsgenauigkeit .....	24
A c) Testung der analytischen Spezifität .....	25
A d) Testung der analytischen Sensitivität .....	25
A e) Testung verschiedener PCR-Thermocycler .....	25
A f) Testung verschiedener DNA-Mischproben .....	26
A g) Testung des Einflusses verschiedener Annealingtemperaturen in der PCR .....	26
A h) Testung verschiedener PCR-Pufferchargen .....	26
A i) Testung der Kurzzeitstabilität .....	27
<b>B Klinische Leistungsdaten .....</b>	<b>27</b>
B a) Probenahme, ethische und regulatorische Aspekte .....	27
B b) Vergleichstestung.....	27
B c) DNA-Extraktion und Aufreinigung .....	28
B d) Ergebnisse.....	28
B e) Referenzen .....	30

## 1. Beschreibung des Mentype® DIPscreen

**Tabelle 1.** Locus-spezifische Informationen für den Mentype® DIPscreen

DIP Locus	Chromosomale Position	Motive (-DIP / + DIP)
<b>FAM Panel</b>		
AM X	Xp22.1-22.3	
AM Y	Yp11.2	
HLD106	16q13	-/AATGCGT
HLD70	6q16.1	-/AGCA
HLD84	8q24.12	-/CTTTC
HLD103	12q23.1	-/GCTTATAA
HLD104	13q32.1	-/ACTC
HLD116	18p11.22	-/AGGTGTCGAACAACATGATAC
HLD112	17p12	-/TTGTA
HLD307	Xp11.23	-/TCAACCAA
HLD310	2p22.3	-/GTCTGGTT
HLD110	16q22.1	-/TCCCTG
HLD133	3p22.1	-/CAACCTGGATT
HLD79	7q31.2	-/AATCT
HLD105	14q24.3	-/ATAGACAA
HLD140	3q23	-/GGTAGTATGGGCCT
HLD163	12q24.31	-/AACTACGGCAGCCCC
<b>BTG Panel</b>		
HLD91	11q14.1	-/GATA
HLD23	18p11.32	-/CTTTAA
HLD88	9q22.33	-/CCACAAAGA
HLD101	15q26.1	-/GTAG
HLD67	5q33.3	-/CTACTGAC
HLD301	17q21.32	-/CAGGGGCTC
HLD53	3q22.1	-/ATGT
HLD97	13q13.1	-/AGAGAAAGCTGAAG
HLD152	16p13.2	-/TGGTCAAAGGCA
HLD128	1q31.3	-/ATTAATA
HLD134	5q11.2	-/ATGATGGTTCTTCAGA
HLD305	20q11.22	-/CAAGGTCCCACCACACTCGCGTGGGA
<b>BTY Panel</b>		
HLD48	2q11.2	-/GACTT
HLD114	17p13.2	-/TCCTATTCTACTCTGAAT
HLD304	9q34.3	-/GAGCTGCTCAAGAGAGAGG
HLD131	7q36.2	-/TTGGGCTTATT
HLD38	1q32.2	-/TAGTT
HLD82	7q21.3	-/ACCTCTACTCCTTGGTCTATTCTGGTCACATGTACT

Abkürzungen: HLD = Human Locus DIP, -DIP = Deletion, +DIP = Insertion

Tabelle 1 zeigt die chromosomale Position, das Sequenzmotiv und die jeweiligen Referenzallele der mit dem Mentype® DIPscreen detektierten DIP-Loci.

## Inhalt

### Mentype® DIPscreen

Kit-Komponente	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® DIPscreen PrimerMix	Primergemisch	125 µL	500 µL	4 x 500 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	Multi Taq2 DNA Polymerase	15 µL	60 µL	4 x 60 µL
Mentype® DIPscreen Control DNA XY13 (2 ng/µL)	Kontroll-DNA XY13 (2 ng/µL)	10 µL	10 µL	10 µL
<b>ODER</b> Control DNA XY82 (2 ng/µL)	<b>ODER</b> Kontroll-DNA XY82 (2 ng/µL)			
DNA Size Standard 550 (BTO)	DNA Längenstandard 550 (BTO)	13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® DIPscreen 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

**Tabelle 2.** Bestellinformationen der Mentype® DIPscreen Kits

Produktname	Packungsgröße	Bestellnummer
Mentype® DIPscreen	25 Reaktionen	45-45410-0025
Mentype® DIPscreen	100 Reaktionen	45-45410-0100
Mentype® DIPscreen	400 Reaktionen	45-45410-0400

## Lagerung

Die Lagerung sollte bei -25 °C bis -15 °C erfolgen. 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.

Mischen Sie keine Kitkomponenten zwischen verschiedenen Kitchargen. Das Aliquotieren der Kitkomponenten in andere Reaktionsgefäße ist nicht gestattet.

## Zusätzliche Reagenzien

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

**Tabelle 3.** Zusätzlich benötigte Reagenzien für Mentype® DIPscreen

Reagenz	Lieferant	Bestellnummer
Hi-Di™ Formamide, 25 mL	Applied Biosystems	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 LEUK01086 (Reaction Mix A Charge CH2000163)

Folgende potenziell gefährliche Substanz ist in diesem Testkit enthalten:

Kitbestandteil	Chemikalie	Gefahr
Reaction Mix A	Natriumazid $\text{NaN}_3$	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

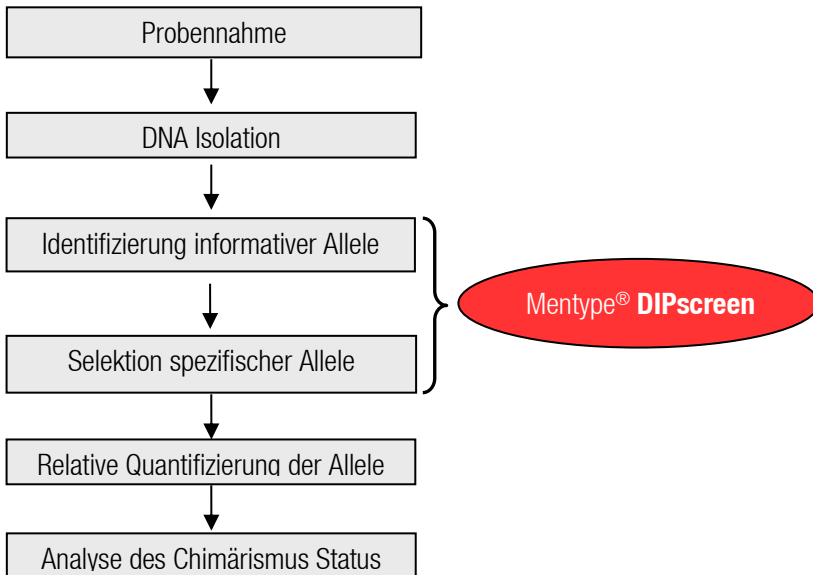
Mentype® ist eingetragenes Warenzeichen Biotype GmbH.

ABI PRISM®, GeneMapper®, GeneAmp® und Applied Biosystems® sind eingetragene Warenzeichen der Applied Biosystems LLC.

POP4® 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).

## Überblick der Chimärismusanalyse mit dem Mentype® DIP-Produkt



Von der Probennahme zur Analyse – die Chimärismusanalyse mit der Mentype® **DIPscreen** Anwendung



## 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 PCR-Master Mixes Mentype® **DIPscreen**

Komponente	Volumen
Nuclease-Free Water	13,4 µL
Reaction Mix A*	5,0 µL
Mentype® <b>DIPscreen</b> PrimerMix	5,0 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,6 µL
<b>Gesamtvolumen des Master Mixes</b>	<b>24,0 µL</b>
Einsatz der Template-DNA bzw. der Kontrollen	1,0 µL

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

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

Die Menge der einzusetzenden DNA richtet sich nach ihrer Konzentration. Für Referenzproben ist meist 1 µL ausreichend. Für kritische Proben mit geringer DNA-Konzentration 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 ist so eingestellt, dass bei **28 PCR-Zyklen** mit **1 ng Kontroll-DNA XY13 oder XY82** 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.

#### Template-DNA

Der optimale DNA-Einsatz beträgt **1-2 ng je Reaktion**. In Abhängigkeit von der angewandten Quantifizierungsmethode kann der Messwert der DNA-Konzentration variieren, so dass die optimale DNA-Menge ggf. anzugleichen ist.

#### Positivkontrolle

**Hinweis:** Ab Chargennummer LEUK01087 enthält das Kit die neue Kontroll-DNA XY82. Diese unterscheidet sich im Vergleich zur bisherigen Kontroll-DNA XY13 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 8 zu finden.

Für die Positivkontrolle verdünnen Sie die Kontroll-DNA XY13 oder XY82 auf 1 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.

## 2.2 PCR Amplifikationsparameter

Um die Multi Taq2 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 28 PCR-Zyklen empfohlen.

### Standard Methode

Empfohlen für alle DNA Proben.

**Tabelle 5.** Standard Amplifikationsprotokoll zur Durchführung von Mentype® DIPscreen

Temperatur	Zeit	
94 °C	4 min	(hot start für Aktivierung der Multi Taq 2 DNA Polymerase)
94 °C	30 s	
<b>60 °C</b>	<b>120 s</b>	<b>28 Zyklen</b>
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	bis zum Ende

**Anmerkung:** Für eine optimale Kitbalance empfehlen wir die Heiz- und Kühlraten der PCR-Geräte auf ca. 4-5 °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 6 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 6.** 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 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 Allelic Ladder des Mentype® **DIPscreen** 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 Allelleiter wird verwendet, um die während der Datenanalyse analysierten Fragmente korrekt zu bestimmen. In jedem Fragmentlängenanalyseauflauf muss die Allelleiter 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 7.** Spezifische Laufparameter zur Fragmentlängenanalyse des Mentype® **DIPscreen**

	ABI 310	ABI 3130	ABI 3500
Injections Voltage [kV]	15.0	3.0	3.0
Run Time	26 min	1500 s	1500 s
Injection Time [s]	5	10	10

Abweichend von den in Tabelle 7 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.

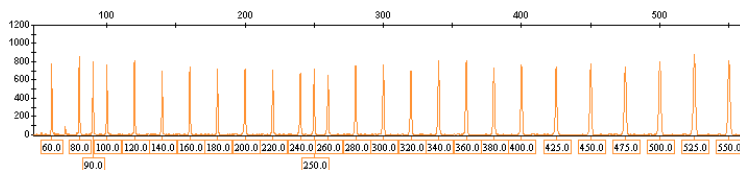
**Hinweis:** Beachten Sie auch die zusätzlichen Informationen zur Kalibrierung und Anwendung der Mentype®-Produkte auf Kapillargel-Elektrophoresegeräten. Diese sind auf Anfrage über [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de) bei Biotype GmbH erhältlich.

#### 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® **DIPscreen** 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. Um eine sichere Analyse zu gewährleisten, sollten möglichst viele, gleichmäßig verteilte Referenzpunkte zur Längenbestimmung herangezogen werden. Hierzu verwenden Sie den DNA Längenstandard 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 Längenstandard 550 (BTO), Fragmentlängen in bp

**Anmerkung:** Für die Auswertung und Analyse des Mentype® **DIPscreen** mit der GeneMapper® ID/ID-X Software kann die bereitgestellte Auswertevorlage des DNA Size Standard 550 (BTO) SST-BTO\_60-450bp verwendet werden.

## 4.1 Biotype® Auswertevorlagen

Die Allelzuordnung der aufgetrennten PCR-Produkte (Genotyping) kann mit Hilfe geeigneter Auswertungssoftware erfolgen, z.B. mit GeneMapper® ID/ID-X in Kombination mit Mentype® **DIPscreen** Auswertevorlagen der Biotype. Biotype® Auswertevorlagen (Template Files) finden Sie auf unserer Homepage ([www.biotype.de](http://www.biotype.de)). Auf Anfrage senden wir Ihnen gerne eine CD-ROM zu. Die empfohlenen Biotype® Vorlagen für die GeneMapper® ID/ID-X Software sind:

Panels	DIPscreen_Panels_v0/v0X*	oder höhere Version
BinSets	DIPscreen_Bins_v0/v0X*	oder höhere Version
Size Standard	SST-BTO_60-450bp	
Analysis Method	Analysis_DIPscreen_310_1000rfu	
	Analysis_DIPscreen_310_200rfu	
	Analysis_DIPscreen_3130_1000rfu	
	Analysis_DIPscreen_3130_200rfu	
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 alleles	

**\*Hinweis:** Auf Grund der neuen Positivkontrolle muss ab Chargennummer LEUK01087 zur Datenauswertung das Panels und BinSet v1/v1X genutzt werden.

Die Panels und BinSets müssen immer verwendet werden, die weiteren Auswertevorlagen sind optional. Die Biotype® Vorlagen für die GeneMapper® ID/ID-X Software wurden für die Verwendung von POP4® generiert. Bei Verwendung anderer Polymertypen müssen ggf. Änderungen an den Panels und BinSets sowie der Analyse Methode vorgenommen werden, bevor die Daten analysiert werden. Eine detaillierte Anleitung hierzu finden Sie auf unserer Homepage ([www.biotype.de](http://www.biotype.de)) als Download bei Biotype® Template Files für GeneMapper®.

**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](mailto: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® **DIPscreen** enthaltene Control DNA XY13 oder XY82 sowie kommerziell erhältliche DNAs, repräsentieren folgende Allele:

**Tabelle 8.** Allelbestimmung des Mentype® **DIPscreen**, - = Deletion, + = Insertion

Locus	Control DNA XY82	Control DNA XY13	ATCC K-562	CCR 9947A	CCR 9948	CCR 3657
AM	XY	XY	XX	XX	XY	XY
HLD106	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+
HLD70	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-
HLD84	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-
HLD103	-/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+
HLD104	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-
HLD116	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-
HLD112	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+
HLD307	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+
HLD310	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
HLD110	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
HLD133	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+
HLD79	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+
HLD105	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+
HLD140	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+
HLD163	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+
HLD91	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+
HLD23	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+
HLD88	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+
HLD101	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
HLD67	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+
HLD301	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-
HLD53	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/-
HLD97	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+
HLD152	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+
HLD128	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+
HLD134	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/-
HLD305	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+
HLD48	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+
HLD114	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+
HLD304	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-
HLD131	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+
HLD38	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+
HLD82	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+

Die Referenz DNA K-562 ist erhältlich bei ATCC. Die DNA 9947A, 9948 und 3657 können von Coriell Cell Repositories bezogen werden

### **4.3 Fragmentlängen und Allele**

Die in Tabelle 9 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 POP4® 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.

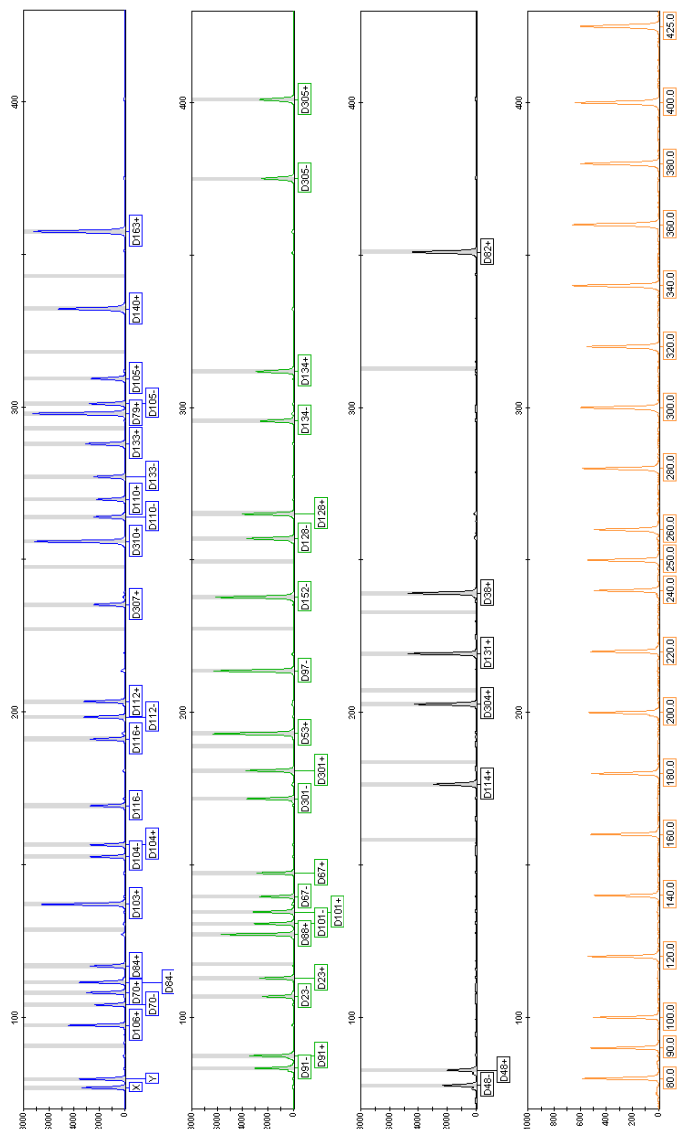
### **Skalierung**

Horizontal: 70-430 bp (siehe Abb. 2A, 2B und 3)

Vertikal: nach Signalintensität der Proben

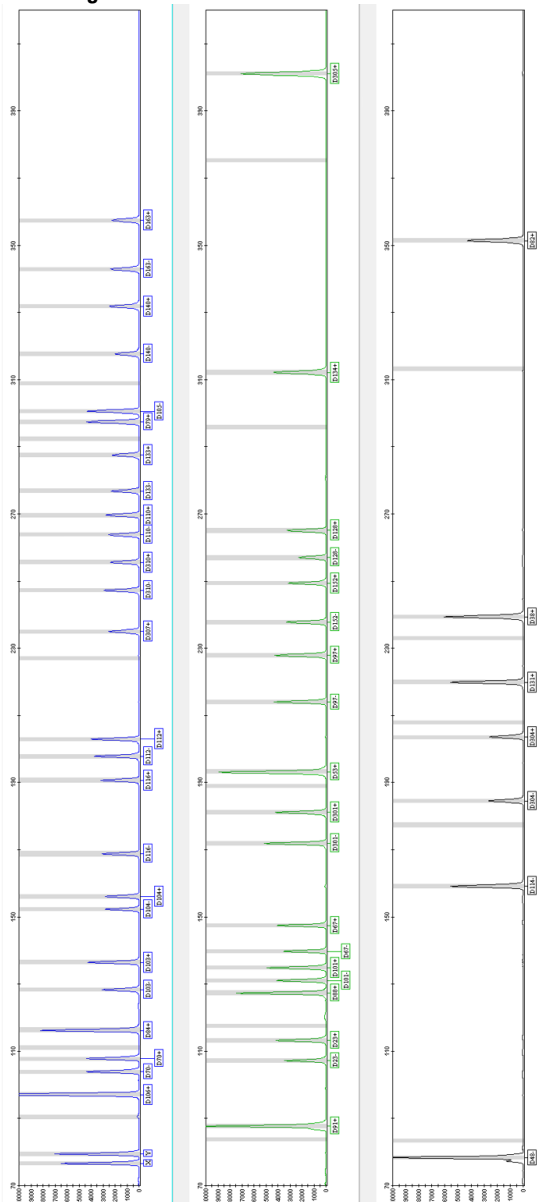


Abbildung 2A

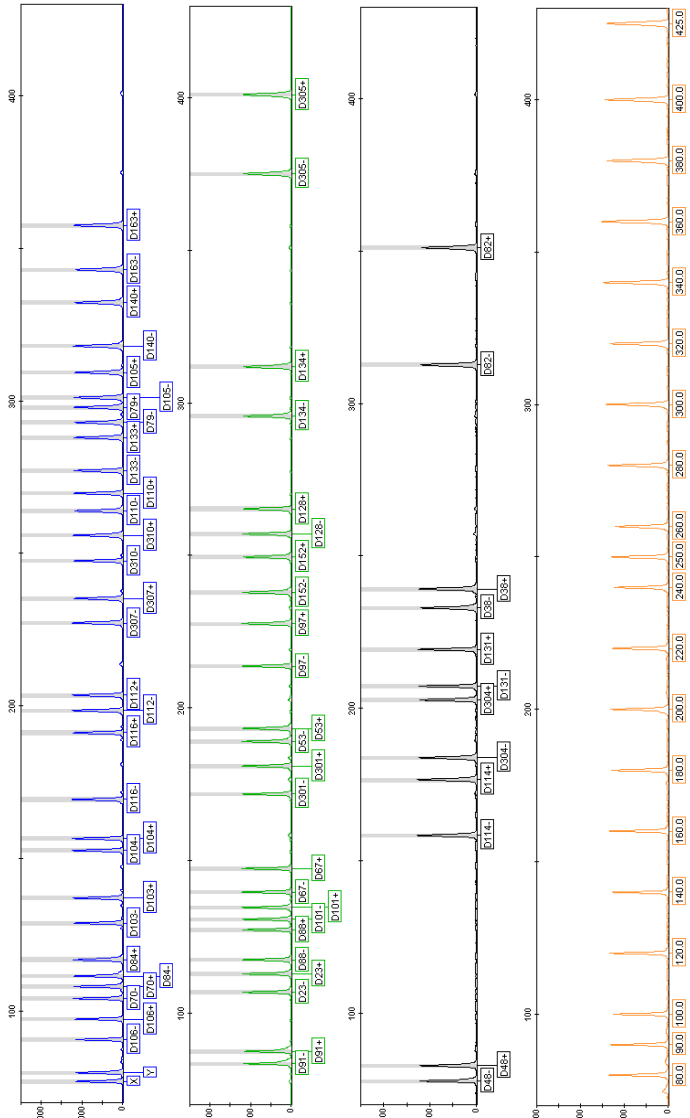


**Abb. 2** Elektropherogramm des Mentype® **DIPscreen** unter Verwendung von 1 ng (A) Kontroll-DNA XY13 bzw. (B) Kontroll-DNA XY82. Die Analyse erfolgte am ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer mit POP4®. Als DNA Längenstandard wurde der BTO 550 verwendet. Die Allelzuordnung wurde mit der GeneMapper® ID Software und dem Mentype® **DIPscreen** Template File durchgeführt.

Abbildung 2B



**Abbildung 3**



**Abb. 3** Elektropherogramm der Alleleiter Mentype® **DIPscreen** analysiert am ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer mit POP4® und dem DNA Size Standard 550 (BTO). Die Allelzuordnung wurde mit der GeneMapper® ID Software und dem Mentype® **DIPscreen** Template File durchgeführt.

**Tabelle 9.** Fragmentlängen der Alleleiter Mentype® **DIPscreen** gemessen am ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer mit POP4® Polymer (FAM, BTG, BTY Panel)

Marker/FAM	-DIP [bp]*	+DIP [bp]*	Marker/BTG	-DIP [bp]*	+DIP [bp]*
AM	77 (X)	80 (Y)	HLD91	84	88
HLD106	91	98	HLD23	107	113
HLD70	104	108	HLD88	118	128
HLD84	112	117	HLD101	131	135
HLD103	129	138	HLD67	140	148
HLD104	153	157	HLD301	172	182
HLD116	170	192	HLD53	190	194
HLD112	199	204	HLD97	214	228
HLD307	228	236	HLD152	239	250
HLD310	248	257	HLD128	258	266
HLD110	264	270	HLD134	296	312
HLD133	278	288	HLD305	375	401
HLD79	294	299			
HLD105	302	310	<b>Marker/BTY</b>	<b>-DIP [bp]*</b>	<b>+DIP [bp]*</b>
HLD140	318	333	HLD48	78	83
HLD163	344	358	HLD114	159	177
			HLD304	184	203
			HLD131	208	220
			HLD38	234	240
			HLD82	314	352

\* gerundet auf ganze Zahlen

## 5. Interpretation der Ergebnisse

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

### 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.

### 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 Analyzelabor 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® **DIPscreen** wurde auf POP4® validiert und zertifiziert. Die Verwendung eines anderen Polymers (z.B. POP7™ oder POP6™) kann das Laufverhalten und die Peakform der spezifischen PCR-Produkte verändern. Außerdem wurde ein erhöhtes Hintergrundausruschen durch ein verändertes Verhalten von freien Fluoreszenzfarbstoffresten beobachtet.

## 6. 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.

**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 (9):1182-1190, 2006.

**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(4):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.

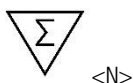
## 7. Erklärung der Symbole



**Hersteller**



**Chargenbezeichnung**



**Ausreichend für <N> Tests**



**Hinweis auf eIFU**



**Verwendbar bis**



**Temperaturbegrenzung**



**Bestellnummer**



**In-vitro-Diagnostika**



**Vor Sonnenlicht schützen**



**Trocken aufbewahren**

## Spezifikationen des Mentype® DIPscreen PCR-Amplifikationskits

### A Analytische Validierung

#### A a) Festlegung der Standardreaktion und chargenspezifischer Toleranzen

**Zielsetzung:** Die Standardreaktion und die chargenspezifischen Toleranzen in Bezug auf die absoluten Signalhöhen (RFU), die Ausgewogenheit der Signalhöhen der Multiplex-PCR und der Basislinie, wurden festgelegt.

**Methodik:** Dem Testkit ist die Kontroll-DNA XY13 eines gesunden Spenders beigelegt, welche in 17 DIP-Systemen und Amelogenin heterozygot ist. Die Standardreaktion (28 PCR-Zyklen) erfolgte mit dieser Kontroll-DNA in der Nennkonzentration von 1 ng 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® 3130 Genetic Analyzer wurden Signalhöhen von 1 000 – 5 000 RFU erzielt. Die Schwankungen für Signalhöhen von heterozygoten Systemen durfte maximal 50 % vom Richtwert betragen. Im Skalierungsbereich wurden bei den Blindwerten keine unspezifischen Signale 200 RFU festgestellt (Basislinie).

#### A b) Testung der Genotypisierungsgenauigkeit

**Zielsetzung:** Die Genauigkeit der Allelzuordnung sollte unter Standardbedingungen statistisch abgesichert werden. Die Testung überprüfte 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. Zusätzlich wurden anhand der Ergebnisse die testspezifischen Geräteeinstellungen für die Genotypisierung mittels Kapillargelelektrophorese (Bins und Panels) für die Auswertevorlagen der DNA-Sequenzierautomaten festgelegt.

**Methodik:** Es wurden 100 vortypisierte humane DNAs von Spendern aus unterschiedlichen Quellen (Vollblut, Wangenabstriche) in Einfachbestimmung untersucht. Zusätzlich wurde ein Blindwert ohne DNA mitgeführt. Als Akzeptanzkriterium wurden Vollprofile mit Peakhöhen > 200 RFU (manuelle Auswertung) definiert [1; 2].

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



### A c) **Testung der analytischen Spezifität**

**Zielsetzung:** Die Untersuchungen dienten 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 Untersuchungen dienten der Bestimmung der analytischen Nachweisgrenze (Sensitivität).

**Methodik:** Es wurde eine Verdünnungsreihe mit 1 ng bis 65 pg Referenz-DNA in Vierfachbestimmung getestet. Als Akzeptanzkriterium wurden komplette DNA-Profile mit > 100 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 Standardreaktion mit Kontroll-DNA in der Nennkonzentration von 1 ng wurden mit allen in Kapitel 1.1 beschriebenen Thermocyclern in vierfachen Bestimmungen mit gleichem Mastermix durchgeführt. Zusätzlich wurden 2 Blindproben ohne DNA untersucht.

**Ergebnisse:** Es wurden keine unspezifischen Nebenprodukte > 200 RFU im Allelbereich nachgewiesen.

Die Abweichung der gemittelten Peakhöhen im Vergleich zur Standardreaktion betrug bei einem definierten Ramping von  $\geq 2$  °C/s maximal 20 %.

### A f) **Testung verschiedener DNA-Mischproben**

**Zielsetzung:** Ziel der Chimärismusanalyse nach allogener Blutstammzelltransplantation ist der getrennte Nachweis und die relative Quantifizierung von Spender- und Empfänger-DNA. Zum Nachweis der minimalen Resterkrankung sollten dabei im Gemisch möglichst geringe Mengen an Empfänger-DNA nachgewiesen werden können. In der analytischen Validierung wurden deshalb verschiedene Mischungen zwei definierter DNAs mit unterschiedlichen Genotypen hergestellt.

**Methodik:** Es wurden 10 unabhängige Gemische von jeweils zwei unverwandten DNAs hergestellt, wobei die unterschüssige DNA zu 0 %, 1 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 % und 70 % eingesetzt wurde. Zwischen zwei DNAs in den Gemischen konnten im Durchschnitt 13 DIP-Loki ( $12,8 \pm 2,22$ ) mit informativen Allelen zur Auswertung hinzugezogen werden. Jeweils 2 ng der DNA-Gemische wurde in der Standardreaktion (siehe Kapitel c) getestet. Es wurden Signalhöhen von mindestens 50 RFU ausgewertet.

**Ergebnisse:** 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 wurden [3-6].

### A g) **Testung des Einflusses verschiedener Annealingtemperaturen in der PCR**

**Zielsetzung:** Zur Bestimmung der Robustheit der PCRs wurden 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 1 ng wurde um  $\pm 1$  °C und  $\pm 2$  °C variiert. Es erfolgte eine 3fache Bestimmung mit dem gleichen Mastermix.

**Ergebnisse:** Für  $\pm 1$  °C wurden keine unspezifischen Nebenprodukte > 200 RFU im Allelbereich festgestellt. Die gemittelten Peakhöhen wichen bei  $\pm 1$  °C maximal  $\pm 30$  % von der Standardreaktion ab. Für + 2 °C wurden bereits stark abfallende Signale in einigen Systemen (HLD 84, 103, 116, 112, 133, 105, 140, 67, 48) festgestellt, ein System (HLD 91) fiel komplett aus.

### 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 sollte die Robustheit des Tests gegenüber Chargenschwankungen des gelieferten PCR-Puffers getestet werden.

**Methodik:** Die Testung von 4 unabhängigen Reaktionsgemisch-A-Chargen erfolgte in der Standardreaktion mit Kontroll- DNA der Nennkonzentration von 1 ng.

**Ergebnisse:** Es wurden keine unspezifischen Nebenprodukte > 200 RFU im Allelbereich nachgewiesen. Die Abweichung der gemittelten Peakhöhen im Vergleich zur Standardreaktion betrug maximal 20 %.

### A i) **Testung der Kurzzeitstabilität**

**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 1 ng 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 zusätzlichen Peaks > 200 RFU innerhalb des Skalierungsbereiches allerdings außerhalb des Allelbereiches festgestellt (freie Farbstoffe im BTG Panel).

## 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 das CE-IVD Mentype® **Chimera**® PCR-Amplifikationskit (Biotype GmbH, Dresden), welches auf Short-Tandem-Repeats (STRs) basiert [12]. Des Weiteren erfolgte eine zytogenetische Unterscheidung von Spender- und Empfängerleukozyten mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridierung (FISH) [11]. Dafür 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**

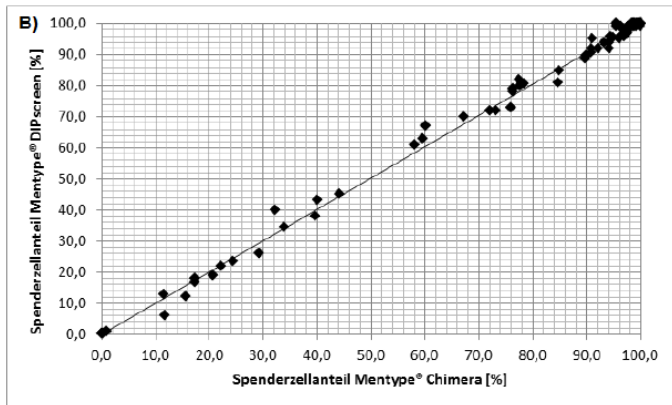
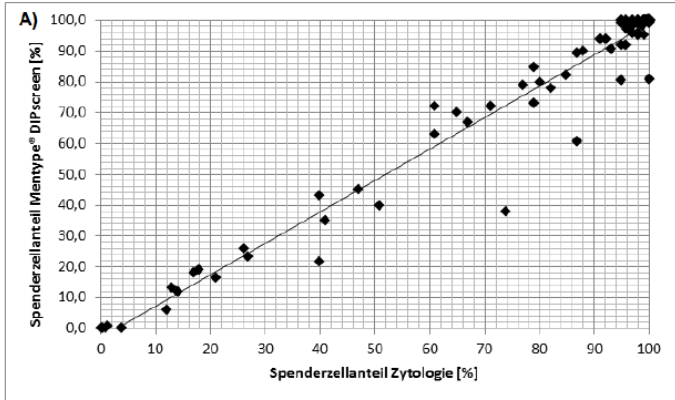
Die DNA-Extraktion aus heparinisiertem Vollblut erfolgte mit dem *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, DE) nach Angaben des Herstellers.

### **B d) Ergebnisse**

Es wurden insgesamt 98 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 geschlechtschromosomenspezifische FISH [5]. Pro PCR wurden mindestens 1,5 ng genomische DNA eingesetzt. Zunächst wurden alle informativen STR- oder DIP-Systeme der Spender-Empfänger-Paare ermittelt und das Geschlecht durch Genotypisierung des Amelogeninmarkers, welcher Bestandteil der Multiplex-PCRs ist, bestätigt. Für die PCR-Befundung wurden Mittelwerte der Signalhöhen aller informativer STR- oder DIP-Systeme verwendet [3]. Die Ergebnisse der Vergleichstestungen sind in Abbildung 1 zusammengefasst.

Im Vergleich zur Zytogenetik zeigten 11 Proben unter Verwendung des Mentype® **DIPscreen** eine Abweichung des Spenderzellanteils von mehr als 5 % (absolut) (siehe Abb. 10A). Bei 5 dieser Proben wurden in der Zytogenetik Zellzahlen von deutlich weniger als 200 ausgezählt. Gemäß Empfehlungen des Herstellers des FISH-Kits sollten jedoch mindestens 200 Zellen ausgezählt werden. Nach Praxisempfehlungen liefern noch höhere absolute Zellzahlen (500-1 000) bessere zytogenetische Ergebnisse [6, 8]. Im Gegensatz zur Zytogenetik betragen die Abweichungen von Mentype® **DIPscreen** zum auf STRs basierten Multiplex-PCR-Kit Mentype® **Chimera**® maximal 7,9 % (siehe Abb. 4B). Nur 3 der 98 Messdatensets zeigten eine Abweichung von mehr als 5 %.

**Abb.4:** Konkordanzanalyse der Multiplex-PCR Mentype® **DIPscreen** im Vergleich zur Zytologie (A) und Multiplex-PCR Mentype® **Chimera**® (B)



**B e) Referenzen**

- 1) **Gilder JR, Doom TE, Inman K, Krane DE.** Run-specific limits of detection and quantitation for STR-based DNA testing. *J Forensic Sci* 2007; 52: 97-101.
- 2) **Schneider PM, Fimmers R, Keil W, Molsberger G, Patzelt D, Pflug W, Rothämel T, Schmitter H, Schneider H, Brinkmann B.** The German Stain Commission: recommendations for the interpretation of mixed stains. *Int J Legal Med.* 2009; 123: 1-5.
- 3) **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. Appendix: Method in focus. *Leukemia* 2001; 15: 303–6.
- 4) **Thiede C.** Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. *Am J Pharmacogenomics* 2004; 4: 177-87.
- 5) **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. Appendix: Method in focus. *Leukemia* 2001; 15: 303–6.
- 6) **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; 90: 1373-9.
- 7) **Henke L, Muche M, Blaauw A, Van Eede PH, Martin W, Helmken C, Budowle B, Henke J.** Validation of a "new" short tandem repeat (STR) fluorescent multiplex system and report of population genetic data. *Clin Lab* 2007; 53:477-82.
- 8) **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.de](mailto:info@biotype.de)[www.biotype.de](http://www.biotype.de)