



# Mentype<sup>®</sup> Chimera<sup>®</sup> PCR Amplification Kit

## Instrucciones de uso

### El nuevo estándar en el análisis de quimerismo

Diagnóstico in vitro



CHNIFU01v3es  
Mayo 2021



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



Denominación del lote



Biotype GmbH  
Moritzburger Weg 67  
01109 DRESDEN  
GERMANY

Made in Germany

Biotype GmbH desarrolla, produce y distribuye aplicaciones basadas en PCR para diagnóstico clínico.

Nuestros kits de análisis Mentype® garantizan los más altos estándares de calidad para clínica e investigación.

En caso de duda o sugerencia estamos a su disposición. Contacte con nosotros o visite nuestra página web [www.biotype.de](http://www.biotype.de)

# Mentype<sup>®</sup> Chimera<sup>®</sup>

## Descripción del producto

Mentype<sup>®</sup> **Chimera**<sup>®</sup> es una aplicación de PCR múltiple para el análisis de quimerismo tras un trasplante de células madre hematopoyéticas y de médula ósea. El kit ha sido desarrollado especialmente para controlar el crecimiento de células del donante tras un trasplante. Mentype<sup>®</sup> **Chimera**<sup>®</sup> ha sido validado mediante el análisis de quimerismo en más de 200 parejas HLA donante-receptor. Además, la idoneidad del ensayo ha sido comprobada y confirmada en una evaluación del rendimiento clínico. El kit se utiliza con éxito en el diagnóstico clínico rutinario.

Los marcadores genéticos de Mentype<sup>®</sup> **Chimera**<sup>®</sup> se distribuyen a lo largo de 12 cromosomas, y representan microsatélites (STRs) muy polimórficos con un elevado grado de heterocigosidad y una distribución equilibrada de alelos. Estas características aumentan la posibilidad de identificar los loci para la diferenciación del donante/receptor y garantizan así la seguridad y la solidez del análisis de quimerismo.

Con Mentype<sup>®</sup> **Chimera**<sup>®</sup> se amplifican simultáneamente en una aplicación de PCR los doce loci autosómicos muy polimórficos **D2S1360, D3S1744, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517, D8S1132, D10S2325, D12S391, D18S51, D21S2055, SE33 (ACTBP2)** y el locus **amelogenina** específico del sexo. Los cebadores están marcados con los colorantes fluorescentes **6-FAM, BTG o BTY**.

El límite de detección para el kit Mentype<sup>®</sup> **Chimera**<sup>®</sup> es de **200 pg de ADN genómico**. El intervalo óptimo en condiciones estándar es de **0,2-1,0 ng de ADN**.

La validación y evaluación del kit de análisis se ha llevado a cabo en los equipos termociclador GeneAmp<sup>®</sup> 9700 Aluminium, Eppendorf Mastercycler ep-S, Biometra, analizador genético ABI PRISM<sup>®</sup> 310 con POP-4<sup>®</sup> y analizador genético ABI PRISM<sup>®</sup> 3130 con POP-4<sup>®</sup>.

## Índice de contenido

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Descripción de Mentype® Chimera®</b> .....                                     | <b>5</b>  |
| <b>2. Amplificación por PCR</b> .....  | <b>8</b>  |
| 2.1 Composición de la mezcla maestra .....   | 8         |
| 2.2 Parámetros de amplificación por PCR .....  | 9         |
| <b>3. Electroforesis capilar en gel</b> .....  | <b>11</b> |
| 3.1 Preparación de los productos de PCR .....  | 11        |
| 3.2 Análisis de la fragmentos .....  | 11        |
| <b>4. Evaluación</b> .....   | <b>13</b> |
| 4.1 Archivos de plantillas Biotype® .....  | 14        |
| 4.2 Controles .....  | 15        |
| 4.3 Longitud de fragmentos y alelos .....  | 15        |
| <b>5. Interpretación de los resultados</b> .....                                     | <b>22</b> |
| <b>6. Datos de la genética de poblaciones</b> .....                                  | <b>24</b> |
| <b>7. Referencias</b> .....  | <b>27</b> |
| <b>8. Explicación de los símbolos</b> .....  | <b>28</b> |
| <b>Especificaciones del kit Mentype® Chimera® de amplificación por PCR..</b>         | <b>29</b> |
| <b>A Validación analítica</b> .....  | <b>29</b> |
| A a) Determinación de la reacción estándar y de las tolerancias específicas del lote | 29        |
| A b) Evaluación de la precisión del genotipado .....                                 | 29        |
| A c) Evaluación de la especificidad analítica .....                                  | 30        |
| A d) Evaluación de la sensibilidad analítica .....                                   | 30        |
| A e) Evaluación de distintos termocicladores de PCR .....                            | 30        |
| A f) Evaluación de distintas muestras variadas de ADN .....                          | 31        |
| A g) Evaluación del efecto de distintas temperaturas de hibridación en la PCR        | 31        |
| A h) Evaluación de distintos lotes de buffer para PCR .....                          | 32        |
| A i) Análisis de inhibidores de PCR .....  | 32        |
| A j) Vida útil desde su apertura .....   | 32        |
| <b>B Datos del rendimiento clínico</b> .....   | <b>33</b> |
| B a) Muestreo y aspectos éticos y normativos .....                                   | 33        |
| B b) Pruebas comparativas .....  | 33        |
| B c) Extracción de ADN y purificación .....  | 33        |
| B d) Resultados .....  | 33        |
| B e) Referencias .....   | 34        |

## 1. Descripción de Mentype® Chimera®

**Tabla 1.** Información específica del locus para Mentype® Chimera®

| Locus         | N.º acceso GenBank® | Patrón de repetición del alelo de referencia   | Alelo de referencia | Intervalo de alelos |
|---------------|---------------------|--|---------------------|---------------------|
| Amelogenina X | M55418              |  |                     |                     |
| Amelogenina Y | M55419              |  |                     |                     |
| D2S1360       | G08130              | [TATC] <sub>9</sub> [TGTC] <sub>9</sub> [TATC] <sub>5</sub>  | 23                  | 19-32               |
| D3S1744       | G08246              | [TCTA] <sub>2</sub> TA[TCTA] <sub>12</sub> TCA [TCTA] <sub>2</sub>   | 16                  | 13-22               |
| D4S2366       | G08339              | [ATAG] <sub>9</sub> ATTG [ATAG] <sub>2</sub>   | 12                  | 9-15                |
| D5S2500       | G08468              | [ATAG] <sub>12</sub>   | 12                  | 9-18                |
| D6S474        | G08540              | [TAGA] <sub>5</sub> TGA [TAGA] <sub>12</sub>   | 17                  | 11-20               |
| D7S1517       | G18365              | [GAAA] <sub>11</sub> CAAA [GAAA] <sub>2</sub> CAAA [GAAA] <sub>2</sub>   | 17                  | 14-31               |
| D8S1132       | G08685              | [TCTA] <sub>9</sub> TCA [TCTA] <sub>9</sub> TCTGTCTA   | 20                  | 12.1-27             |
| D10S2325      | G08790              | [TCTTA] <sub>12</sub>  | 12                  | 6-23                |
| D12S391       | G08921              | [AGAT] <sub>5</sub> GAT [AGAT] <sub>7</sub> [AGAC] <sub>6</sub> AGAT   | 19.3                | 13-28               |
| D18S51        | L18333              | [AGAA] <sub>13</sub>   | 13                  | 5.3-42              |
| D21S2055      | G27274              | [CTAT] <sub>2</sub> CTAA [CTAT] <sub>9</sub> CTA [CTAT] <sub>3</sub> TAT<br>[CTAT] <sub>3</sub> TAT [CTAT] <sub>4</sub> CAT[CTAT] <sub>2</sub> | 24                  | 16.1-39             |
| SE33 (ACTBP2) | NG000840            | [AAAG] <sub>9</sub> AA [AAAG] <sub>16</sub>  | 25.2                | 3-50                |

La tabla 1 muestra los loci STR con sus patrones de repetición y alelos. La nomenclatura se ajusta a las directrices de la «Sociedad Internacional de Genética Forense, (ISFG)» (Bär *et al.*, 1997). En el caso de los loci STR D8S1132 y D12S391 se aplica la nomenclatura según Hering y Müller (2001); para los loci D4S2366 y D6S474 la nomenclatura según Becker *et al.* (2007); para el locus D10S2325, la nomenclatura según Wiegand *et al.* (1999); y para el locus D7S1517, se aplica la nomenclatura según Wiegand y Klitschar (2002). El intervalo de alelos indicado tiene en cuenta los alelos conocidos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, versión 12/2008) así como la bibliografía actual.

**Tabla 2.** Mapa cromosómico para Mentype® Chimera®

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

## Contenido

### Mentype® Chimera®

| Etiqueta   | Contenido   | Volumen          |                   |                   |
|--|---|------------------|-------------------|-------------------|
|  |   | 25<br>Reacciones | 100<br>Reacciones | 400<br>Reacciones |
| Nuclease-Free Water  | Agua libre de nucleasas   | 1,5 mL           | 2 x 1,5 mL        | 6 x 1,5 mL        |
| Reaction Mix A   | Mezcla de reacción A  | 125 µL           | 500 µL            | 2 x 1,0 mL        |
| Mentype® Chimera®<br>Primer Mix                              | Mezcla de cebador   | 63 µL            | 250 µL            | 4 x 250 µL        |
| Multi Taq 2 DNA Polymerase<br>o Polymerase N*                | ADN polimerasa Multi Taq 2 o polimerasa N*                        | 10 µL            | 40 µL             | 160 µL            |
| Mentype® Chimera®<br>Control DNA XY5 o<br>Control DNA XY1726 | ADN de control XY5 (2 ng/µL) o<br>ADN de control XY1726 (2 ng/µL) | 10 µL            | 10 µL             | 10 µL             |
| DNA Size Standard 550<br>(BTO)                               | Patrón de tamaño molecular 550 (BTO)                              | 13 µL            | 50 µL             | 200 µL            |
| Mentype® Chimera®<br>Allelic Ladder                          | Escalera alélica  | 25 µL            | 25 µL             | 4 x 25 µL         |

\* A partir del número de lote **LEUK01093** en adelante, el kit contiene el nuevo Polymerase N.

Tenga en cuenta que los componentes de los diferentes lotes de kits no deben mezclarse. Se puede encontrar una vista general de los números de lote en la etiqueta situada en el interior de la tapa de la caja. No está permitido utilizar alícuotas de los componentes del kit en otros recipientes de reacción.

### Información del pedido

|                   |     |            |               |               |
|-------------------|-----|------------|---------------|---------------|
| Mentype® Chimera® | 25  | Reacciones | N.º de pedido | 45-13210-0025 |
| Mentype® Chimera® | 100 | Reacciones | N.º de pedido | 45-13210-0100 |
| Mentype® Chimera® | 400 | Reacciones | N.º de pedido | 45-13210-0400 |

**Nota:** Tenga en cuenta que el tamaño de embalaje 1000 para reacciones ya no está a la venta.

### Almacenamiento

Se almacena a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C. Debe evitarse la descongelación y la congelación repetidas. La mezcla de cebador y la escalera alélica deben almacenarse protegidas de la luz. El ADN de control y los reactivos post-PCR (escalera alélica y patrón de longitud de ADN) deben almacenarse separados de los reactivos de PCR. El período de validez del kit de análisis figura en la etiqueta del envase.

### Otros reactivos

En el caso de la amplificación por PCR y la preparación de la muestra, además de los componentes incluidos en el kit de análisis, se requieren los reactivos siguientes:

**Tabla 3.** Otros reactivos requeridos para la ejecución de Mentype® Chimera®

| Reactivo  | Proveedor                     | Número de pedido |
|---|-------------------------------|------------------|
| Formamida Hi-Di™, 25 mL                                       | Life Technologies Corporation | 4311320          |
| Matrix Standards BT5 single-capillary instruments (5 x 25 µL) | Biotype GmbH                  | 00-10411-0025    |
| Matrix Standards BT5 multi-capillary instruments (25 µL)      | Biotype GmbH                  | 00-10421-0025    |
| Matrix Standards BT5 multi-capillary instruments (2 x 25 µL)  | Biotype GmbH                  | 00-10421-0050    |

### Advertencias e indicaciones de seguridad

Por favor, observe la ficha de seguridad.

A petición están disponibles las fichas de seguridad de los componentes del kit. Para las fichas de seguridad de los reactivos no incluidos en el kit de análisis deberá contactar con el fabricante correspondiente.

### Para lote LEUK01073 (Reaction Mix A lote CH1901224)

Este kit de análisis contiene las siguientes sustancias potencialmente peligrosas:

| Componente del kit | Producto químico                | Peligro   |
|--------------------|---------------------------------|---|
| Reaction Mix A     | Azida de sodio NaN <sub>3</sub> | tóxico al ingerir, en contacto con ácidos produce gases tóxicos |

### Control de calidad

El contenido íntegro del kit está sujeto a un control de calidad intenso por parte de Biotype GmbH. La calidad de los kits de análisis se examina continuamente para demostrar su utilización ilimitada. Le rogamos se ponga en contacto con nosotros en relación con todas las cuestiones relacionadas con el control de calidad.

### Marcas y patentes

Mentype® y Chimera® son marcas registradas de Biotype GmbH. ABI PRISM® y GeneScan® son marcas registradas en Alemania de Applied Biosystems LLC; GeneMapper®, GeneAmp® y Applied Biosystems® son marcas registradas de Applied Biosystems LLC.

POP-4® es una marca registrada en Europa de Applied Biosystems LLC.

La PCR goza de la protección de patente. Los titulares de la patente son las empresas Roche Molecular Systems y F. Hoffmann-La Roche (Roche).

## Protocolos para la amplificación por PCR, electroforesis y evaluación

### 2. Amplificación por PCR

#### 2.1 Composición de la mezcla maestra

La siguiente tabla muestra los volúmenes de los componentes del kit utilizados en 1,0 µL de volumen de muestra (patrón de ADN) en un volumen de reacción de 25 µL. Para la cantidad de reacciones de PCR que deban llevarse a cabo, tenga en cuenta los controles positivos y negativos. Añada al número total una o dos reacciones para compensar los errores de pipeteo.

**Tabla 4.** Composición de la mezcla maestra para Mentype® Chimera®

| Componentes  | Volumen |
|--|---------|
| Nuclease-Free Water  | 16,1 µL |
| Reaction Mix A*  | 5,0 µL  |
| Mentype® Chimera® Primer Mix   | 2,5 µL  |
| Multi Taq 2 DNA Polymerase (arranque en caliente, 2,5 U/µL) • Polymerase N | 0,4 µL  |
| Cantidad total de la mezcla maestra  | 24,0 µL |

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

Todos los reactivos deben mezclarse antes de componer la mezcla maestra (con agitador vórtex) y centrifugarse brevemente (aprox. 10 s).

La cantidad de ADN que vaya a utilizarse viene determinada por su concentración. En el caso de las muestras de referencia, en general es suficiente con 1 µL. En caso de muestras críticas de pacientes, la cantidad de patrón puede aumentarse correspondientemente. La cantidad de agua libre de nucleasas se debe corregir en consecuencia, de modo que el volumen total de la composición para la PCR sea siempre de 25 µL.

Almacene sus muestras de ADN en agua libre de nucleasas o en un buffer TE diluido (10 mM Tris HCl, pH 8.0 y 1 mM EDTA), p. ej. 0,1 x TE buffer.

La mezcla de cebador se ajusta de tal manera que en **30 ciclos de PCR con 0,5 ng de ADN de control XY5 o XY1726** se alcancen alturas de picos equilibrados en un volumen de reacción de 25 µL. En el caso de que se utilice más ADN patrón, se alcanzarán picos muy altos con fragmentos pequeños de PCR y picos proporcionalmente bajos con fragmentos mayores de PCR. Reduzca la cantidad de ADN para corregir ese desequilibrio.

#### Control positivo

**Nota:** A partir del número de lote **LEUK01071** en adelante, el kit contiene el nuevo ADN de Control Positivo **XY1726**. Este se diferencia del ADN de control previo XY5 en su perfil genético. La concentración y el procedimiento experimental asociado permanecen sin cambios. Puede utilizar el número de lote del kit y el índice (en la etiqueta de la caja del kit) para determinar qué ADN de control se incluye en el kit. El nuevo perfil genético y los alelos por detectar pueden encontrarse en la Figura 2B y la Tabla 9.



Para el control positivo, diluya el ADN de control XY5 o XY1726 a 0,5 ng/ $\mu$ L en el volumen correspondiente. Pipetee el ADN de control diluido en lugar del ADN patrón en el pocillo de la reacción con la mezcla maestra para la PCR correspondiente.

### Control negativo

Como control negativo pipetee agua libre de nucleasas en lugar del ADN patrón en el recipiente de reacción con la mezcla maestra para la PCR.

### ADN patrón

Dependiendo del método de cuantificación aplicado, el valor de medición de la concentración de ADN puede variar, de modo que, dado el caso, se deberá adaptar correspondientemente la cantidad de ADN óptima.

## 2.2 Parámetros de amplificación por PCR

Para activar la ADN polimerasa Multi Taq 2 y eliminar la formación de productos de amplificación inespecíficos, es importante iniciar un «arranque en caliente».

El número de ciclos depende de la cantidad de ADN. Para todas las muestras se recomienda 30 ciclos de PCR. Para material crítico (< 100 pg de ADN) se recomienda hasta 32 ciclos para lograr una intensidad de señalización óptima.

### Método estándar

Recomendado para todas las muestras de ADN

**Tabla 5.** Protocolo estándar de amplificación para PCR

| Temperatura  | Tiempo  |                  |
|--------------|---|------------------|
| 94 °C        | 4 min (arranque en caliente para la activación de la ADN polimerasa Multi Taq2) |                  |
| 94 °C        | 30 s  |                  |
| <b>60 °C</b> | <b>120 s</b>  | <b>30 ciclos</b> |
| 72 °C        | 75 s  |                  |
| 68 °C        | 60 min  |                  |
| 10 °C        | $\infty$  | hasta el final   |

### Opcional

Recomendado para cantidades pequeñas de ADN

**Tabla 6.** Protocolo opcional de amplificación de PCR para pequeñas cantidades de ADN

| Temperatura  | Tiempo       |   |
|--------------|--------------|---|
| 94 °C        | 4 min        | (arranque en caliente para la activación de la ADN polimerasa Multi Taq2) |
| 94 °C        | 30 s         |   |
| <b>60 °C</b> | <b>120 s</b> | <b>32 ciclos</b>  |
| 72 °C        | 75 s         |   |
| 68 °C        | 60 min       |   |
| 10 °C        | ∞            | hasta el final  |

**Observación:** En el caso de equipos de PCR que ofrecen velocidades rápidas de calentamiento y refrigeración ( $> 2$  °C/s) recomendamos ajustar la rampa en 2 °C/s para un equilibrio óptimo del kit.

Debido a las escasas cantidades de ADN puede haber descensos estadísticos (pérdida de alelos) y alturas de pico desequilibradas. Además, aumenta la probabilidad de productos de amplificación inespecíficos. Con un número de ciclos creciente puede producirse también una contaminación cruzada con cantidades mínimas de ADN extraño.

### 3. Electroforesis capilar en gel

#### 3.1 Preparación de los productos de PCR

Al final de la PCR, retire las muestras del termociclador y centrifúguelas brevemente. Descongele los reactivos formamida Hi-Di™ (no incluida en el kit) y DNA Size Standard 550 (BTO), mezcle los tubos de ensayo brevemente y centrifúguelos brevemente. Prepare la composición descrita en la tabla 7 de formamida Hi-Di™ y el patrón de tamaño BTO (550), y añada a la mezcla exceso para una o dos reacciones para compensar las variaciones producidas por el pipeteo.

**Tabla 7. Composición de la mezcla de desnaturalización**

| Componentes                 | Volumen por reacción |
|-----------------------------|----------------------|
| Formamida Hi-Di™            | 12,0 µL              |
| DNA Size Standard 550 (BTO) | 0,5 µL               |

Pipetee 12 µL de la mezcla de desnaturalización de formamida y DNA Size Standard 550 (BTO) en la cantidad correspondiente de pocillos de una placa de PCR (adecuada para su uso en un analizador genético). Después, añada o bien 1 µL de producto de PCR, o bien 1 µL de escalera alélica (Allelic Ladder) de Mentype® **Chimera**® por pocillo. Tape la placa de PCR con un cubre adhesivo adecuado, mézclela en el vórtex y centrifugue la placa brevemente. Retire el cubre adhesivo y tape la placa con la tapa del fabricante del aparato.

**Nota:** La escalera alélica se utiliza para determinar correctamente los fragmentos analizados durante el análisis de datos. En cada análisis de fragmentos, la escalera alélica debe ser analizada al menos una vez para garantizar el análisis satisfactorio de los datos.

**Nota:** Los capilares del aparato de electroforesis en gel no deben estar secos. Si las muestras no ocupan todas las posiciones de los capilares, rellene los pocillos restantes de la placa con 12 µL de formamida Hi-Di™ según el número de capilares.

Desnaturalice los productos de PCR preparados en un termociclador de PCR durante 3 minutos a 95 °C, enfríe las muestras en un ciclador a 4 °C. Centrifugue brevemente las muestras antes de ejecutar el análisis de fragmentos.

#### 3.2 Análisis de la fragmentos

Se pueden encontrar instrucciones generales sobre el analizador, la producción de la matriz y la aplicación del software GeneMapper™ en el manual correspondiente *ABI PRISM® Genetic Analyzer User's Manual*.

Después de haber efectuado la calibración espectral del dispositivo de electroforesis capilar en gel con el reactivo Matrix Standard BT5 (Biotype GmbH), cree un módulo de

funcionamiento específico (ABI 310, ABI 3130) o un protocolo de instrumentos (ABI 3500) con los siguientes parámetros:

**Tabla 8.** Parámetros de funcionamiento específicos para el análisis de la fragmentos de Mentype® **Chimera**®

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

No obstante lo dispuesto en los valores de la tabla 8, el tiempo de ejecución puede ajustarse para analizar todos los fragmentos (60-550 bp) del patrón de tamaño 550.

**Nota:** Siga las instrucciones del fabricante del equipo de electroforesis capilar en gel para ajustar los parámetros de funcionamiento específicos.

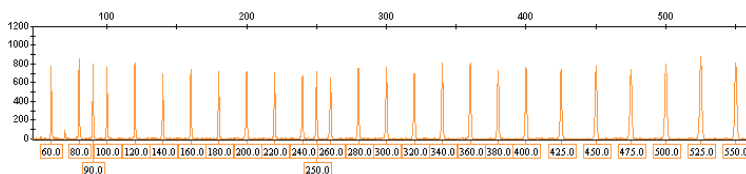
**Nota:** Tenga en cuenta asimismo la información adicional sobre calibración y aplicación de los productos Mentype® en aparatos de electroforesis capilar en gel. Esta puede solicitarse a Biotype GmbH a través de [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de).

#### 4. Evaluación

Se pueden encontrar instrucciones generales para la evaluación automática en el manual correspondiente *ID/ID-X Software User's Manual* de *GeneMapper®*.

**Observación:** El panel rojo debe ocultarse con *Mentype® Chimera®*.

La determinación de la longitud exacta del fragmento de los productos amplificados depende del tipo de aparato, de las condiciones de la electroforesis y del patrón de tamaño de ADN. Debido a la complejidad de algunos loci STR, debe utilizarse el número máximo de puntos de referencia equidistantes para la determinación de la longitud. Para ello, utilice el patrón de tamaño de ADN 550 (BTO) con las longitudes de fragmentos **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 y 550** bp.



**Imagen 1** Electroferograma del patrón de tamaño molecular 550 (BTO), longitud del fragmento en bp

**Observación:** Para la evaluación y el análisis de *Mentype® Chimera®* con el software *ID/ID-X* de *GeneMapper®* puede utilizarse el archivo de plantillas facilitado del patrón de longitud de ADN SST BTO\_60-500pb.

#### 4.1 Archivos de plantillas Biotype®

La clasificación de los productos de PCR fraccionados (genotipado) puede realizarse con ayuda de un software de evaluación adecuado, p. ej. con el software ID/ID-X de GeneMapper® en combinación con los archivos de plantillas Mentype® Chimera® de Biotype. Los archivos de plantillas Biotype® (Template Files) pueden descargarse en nuestra página web ([www.biotype.de](http://www.biotype.de)). A petición le enviaremos un CD-ROM.

Los archivos de plantillas de Biotype® recomendados para el software ID/ID-X de GeneMapper® son:

|                 |                         |                        |
|-----------------|-------------------------|------------------------|
| Panels          | Chimera_Panels_v1/v1X*# | o una versión superior |
| BinSets         | Chimera_Bins_v1/v1X*#   | o una versión superior |
| Size Standard   | SST-BT0_60-500bp        |                        |
| Analysis Method | Analysis_HID_310        |                        |
|                 | Analysis_HID_3130       |                        |
|                 | Analysis_HID_310_50rfu  |                        |
|                 | Analysis_HID_3130_50rfu |                        |
| Plot Settings   | PlotsBT5_4dyes          |                        |
| Table Settings  | Table for 2 Alleles     |                        |
|                 | Table for 10 Alleles    |                        |

#Debido al nuevo Control Positivo, el Panel y el Set de Contenedores **v2** deben utilizarse para evaluación de datos a partir del número de lote de kits **LEUK01071**.

Los paneles y conjuntos de bins deben ser utilizados siempre, el resto de archivos de plantillas son opcionales.

Otros archivos de plantillas recomendados de Biotype® para el software ID-X de GeneMapper® son:

|          |                      |                        |
|----------|----------------------|------------------------|
| Stutter* | Chimera_Stutter_v1X# | o una versión superior |
|----------|----------------------|------------------------|

\* Al cargar los paneles mencionados anteriormente no se aceptan los ajustes del stutter, por lo que el archivo del stutter debe ser importado de forma adicional.

**Aviso importante:** La importación y la clasificación de alelos mediante los archivos de plantillas ofrecidos solo puede garantizarse para el software ID/ID-X de GeneMapper® : En caso de tener que utilizar GeneMapper® pueden surgir problemas al importar algunos archivos de plantillas. En este caso, debería adaptar los paneles y bins a la configuración específica de su equipo con una o varias ejecuciones de la escalera alélica. En caso de requerir ayuda, contacte con nuestro servicio de asistencia técnica ([support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)).

#### Procedimiento general para ejecutar la evaluación

1. Compruebe el patrón de tamaño molecular (Size Standard)
2. Compruebe la escalera alélica (Allelic Ladder)
3. Compruebe el control positivo
4. Compruebe el control negativo
5. Evaluar los datos de las muestras

## 4.2 Controles

El ADN de control XY5 o XY1726 incluido en Mentype® **Chimera**® así como los ADNs disponibles en el mercado representan los siguientes alelos:

**Tabla 9.** Clasificación de alelos con Mentype® **Chimera**®

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

En la tabla se muestran los alelos de ADNs de referencia disponibles en ATCC y en el Depósito Coriell. De este modo se cumplen los requisitos de Szibor *et al.* (2003).

## 4.3 Longitud de fragmentos y alelos

Los valores especificados en la tabla 10 a la tabla 12 para longitudes de fragmento de alelos individuales se refieren al patrón de tamaño molecular 550 (BTO) y la medición en el analizador genético ABI PRISM® 3130 con polímero POP-4®. Pueden producirse variaciones al utilizar otros equipos de análisis, otros patrones de tamaño molecular u otros polímeros.

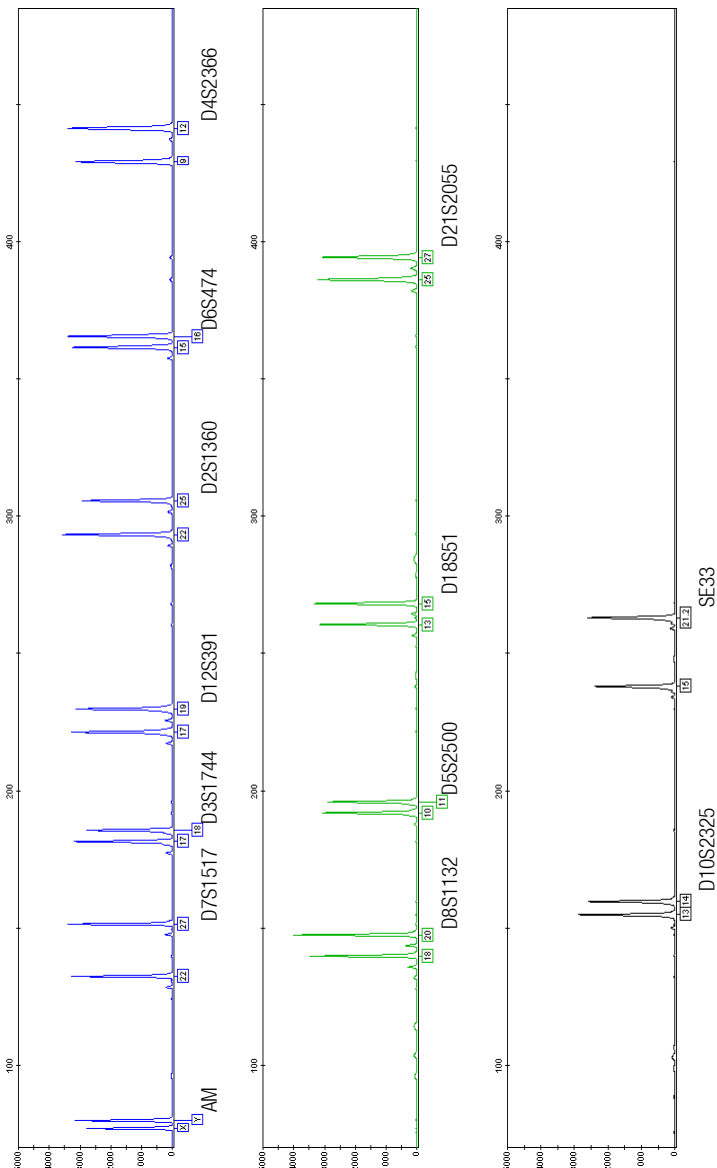
Debido a la diferencia específica del equipo se recomienda el ajuste individual del equipo a utilizar (fine tuning) tras la medición de fragmentos análisis de fragmentos. Además, se debe llevar a cabo una comparación visual con la escalera alélica.

## Escalado

Horizontal: 70-480 bp

Vertical: según la intensidad de la señal de las muestras

Imagen 2A



**Imagen 2** Electroferograma de Mentype® **Chimera**® utilizando 500 pg de **(A)** ADN de control XY5 o **(B)** ADN de control XY1726. El análisis se ha realizado en el analizador genético ABI PRISM® 3130 con el patrón de longitud de ADN 550 (BTO). La clasificación de alelos ha sido realizada con el software ID de GeneMapper® y el archivo de plantillas Mentype® **Chimera**®.



## Imagen 2B



Imagen 3

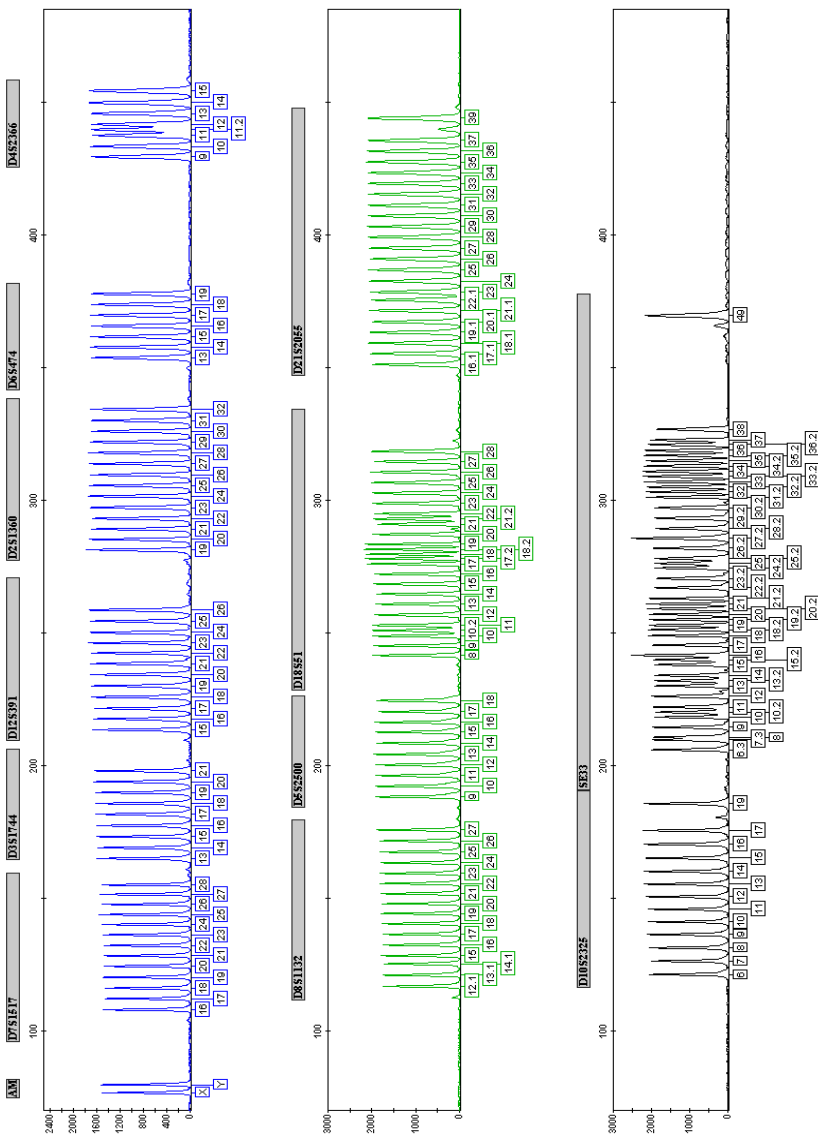


Imagen 3 Electroferograma de la escalera alélica Mentype® Chimera® analizado en el analizador genético ABI PRISM® 3130 . La clasificación de alelos ha sido realizada con el software ID de GeneMapper® y el archivo de plantillas Mentype® Chimera®.

**Tabla 10.** Longitudes de fragmentos de la escalera alélica Mentype® Chimera® medidas en el analizador genético ABI PRISM® 3130 con polímero POP-4® (panel azul)

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

**Tabla 11.** Longitudes de fragmentos de la escalera alélica Mentype® Chimera® medidas en analizador genético ABI PRISM® 3130 con polímero POP-4® (panel verde)

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

**Tabla 12.** Longitudes de fragmentos de la escalera alélica Mentype® **Chimera**® medidas en el analizador genético ABI PRISM® 3130 con polímero POP-4® (panel amarillo)

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

\* redondeado a números enteros

\*\* Estos alelos fuera de la escalera alélica o «off ladder» del pool de ADN de Biotype han sido clasificados con los archivos de plantilla actuales de Biotype® para el software ID/ID-X de GeneMapper®. Para otros alelos véase, entre otros, [http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str\\_fact.htm](http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm)

† Para una mejor orientación, estos alelos han sido representados dentro de la escalera alélica en negrita.

## 5. Interpretación de los resultados

Mediante la evaluación descrita anteriormente con clasificación automática de alelos se garantiza una diferenciación exacta y fiable de los alelos.

A partir de los datos sin procesar de un análisis de fragmentos se puede realizar directamente un cálculo de la proporción de ADN del donante.

Para poder comparar resultados obtenidos con Mentype® **Chimera**® con los resultados de análisis citológicos (análisis FISH) se deben utilizar al menos 500 leucocitos en el análisis citológico.

### **Superposiciones** (Pull-up Peaks o picos de pequeña intensidad)

Pueden producirse superposiciones entre los cromatogramas en el caso de que se utilice una matriz no adecuada para el análisis o existan alturas de picos fuera del rango de detección lineal del equipo. Las superposiciones pueden reconocerse porque aparecen en la misma posición que picos específicos pero en otros paneles cromáticos (por lo general, con bajas intensidades de señal).

### **Bandas stutter** (Stutter Peaks o picos stutter)

La aparición de bandas stutter depende de la secuencia y del número de unidades de repetición. En el caso de las secuencias de tetranucleótidos STR, estas ocurren debido a un error de la ADN polimerasa Taq durante los picos n-4 de la PCR, es decir, el pico stutter es 4 bases menor que el alelo real. Las unidades de repetición son omitidas en el STR. Para evaluar los picos se aplican los modelos de los archivos de plantillas para el software ID/ID-X de GeneMapper™.

### **Acumulación de nucleótidos independiente del molde**

Debido a su actividad de transferasa terminal, la ADN polimerasa Taq tiende a adherir una adenosina al extremo 3' del fragmento de ADN amplificado. Dicha adherencia no ocurre cuando el sistema de PCR no cuenta con el tiempo suficiente para la extensión o cuando las secuencias de cebadores no favorecen la extensión. Este artefacto es reconocible por la aparición de un fragmento acortado en una base (pico de -1 bp). Todos los cebadores Biotype® están diseñados de tal forma que dicha formación de artefactos queda minimizada. La formación del artefacto se reduce además por el paso final de extensión en el protocolo de PCR (68 °C durante 60 min). La altura del pico del artefacto disminuye con grandes cantidades de ADN. Para la evaluación de los picos, cada laboratorio de análisis debe establecer sus propios valores máximos.

### **Artefactos**

La temperatura ambiente puede afectar al comportamiento de los productos de PCR en unidades capilares y, a baja temperatura, pueden aparecer shoulder peaks o picos dobles (Split Peaks). La clasificación automática de alelos puede, además, verse afectada. En el caso de observarse dichos efectos, recomendamos inyectar de nuevo la muestra con más escaleras alélicas por ciclo.

### **Influencia del tipo de polímero**

Mentype® **Chimera**® ha sido validado y certificado en POP-4®. El uso de otro polímero (p. ej. POP-7 o POP-6) puede modificar el comportamiento y la forma de los picos de los productos específicos de PCR. Además, se observó un aumento del ruido de fondo a través de un cambio en el comportamiento de los residuos de colorante fluorescente libre.

## 6. Datos de la genética de poblaciones

Los datos de la genética de poblaciones más relevantes para cada marcador STR están indicados en las tablas 13-16. La fórmula para el cálculo del **contenido de información del polimorfismo** (PIC) fue publicada por Botstein *et al.* (1980), la fórmula para la **heterocigosidad esperada** (HET) por Nei y Roychoudhury *et al.* (1974), y la fórmula para el cálculo del **poder de discriminación** (PD) por Jones *et al.* (1972). Todas las fórmulas son aptas para marcadores autosómicos.

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

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

$$\text{PD} = 1 - \sum_i f_i^2$$

**Tabla 13.** Datos de la genética de poblaciones

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



**Tabla 14.** Datos de la genética de poblaciones

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

**Tabla 15.** Datos de la genética de poblaciones

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

**Tabla 16.** Datos de la genética de poblaciones

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

Todos los datos de genética de poblaciones se basan en un estudio realizado por Biotype GmbH con aprox. 210 individuos caucásicos no emparentados.

## 7. Referencias

**Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayr W, Olaisen B (1997)** DNA Recommendations. Further report of the DNA commission of the ISFG regarding the use of short tandem repeat systems. *Int J Legal Med* 110:175-176.

**Becker D, Vogelsang D, Brabetz W (2007)** Population data on the seven short tandem repeat loci D4S2366, D6S474, D14S608, D19S246, D20S480, D21S226 and D22S689 in a German population. *Int J Legal Med* 121:78-81.

**Botstein D, White RI, Skolnick M, Davis RW (1980)** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331.

**Hering S, Müller E (2001)** New allele and mutational events in D12S391 and D8S1132: sequence data from an eastern German population. *Forensic Sci Int* 124:187-191.

**Jones DA (1972)** Blood samples: Probability of Discrimination. *J Forensic Sci Soc* 12:355-359.

**Nei M, Roychoudhury AK (1974)** Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76:379–390.

**Szibor R, Edelmann J, Hering S, Plate I, Wittig H, Roewer L, Wiegand P, Cali F, Romano V, Michael M (2003)** Cell line DNA typing in forensic genetics – the necessity of reliable standards. *Forensic Sci Int* 138 37-43.

**Wiegand P, Lareu M. V., Schürenkamp M (1999)** D18S535, D1S1656 and D10S2325: three efficient short tandem repeats for forensic genetics. *Int J Legal Med* 112:360-363.

**Wiegand P, Klintschar M (2002)** Population genetic data, comparison of the repeat structure and mutation events of two short STRs. *Int J Legal Med* 116:258-261.

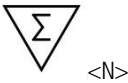
### 8. Explicación de los símbolos



**Fabricante**



**Código del lote**



**Suficiente para <N> pruebas**



**Referencia a eIFU**



**Fecha de caducidad**



**Límite de temperatura**



**Número de pedido**



**Diagnóstico in vitro**



**Proteger de la luz**



**Mantener seco**

## Especificaciones del kit Mentype® Chimera® de amplificación por PCR

### A Validación analítica

#### A a) Determinación de la reacción estándar y de las tolerancias específicas del lote

**Objetivo:** Determinación de la reacción estándar y de las tolerancias específicas de los lotes en relación con los niveles de señal absolutos (RFU), el equilibrio de los niveles de señal de la PCR múltiple y la línea base.

**Metodología:** El kit de análisis viene acompañado de un ADN de control, el cual es heterocigótico en la mayoría de sistemas STR. La reacción estándar se ha realizado con el ADN de control en la concentración nominal de 500 pg en determinación cuádruple. Se efectuaron asimismo cuatro valores blancos (sin control patrón, NTC) sin ADN.

**Resultados:** En el caso de la mezcla por lotes de los cebadores de la PCR, se han establecido las especificaciones siguientes: Utilizando un analizador genético *ABI PRISM® 310* se han establecido niveles de señal de 1 000-4 000 RFU y con un analizador genético *ABI PRISM® 3130* se han establecido niveles de señal de 1 000-5 000 RFU. Las variaciones para niveles de señal de sistemas heterocigóticos no superarán el 30 % del valor de referencia. En el intervalo de escalado no se han detectado señales inespecíficas de  $\geq 50$  RFU (línea base) para los valores blancos.

#### A b) Evaluación de la precisión del genotipado

**Objetivo:** En condiciones estándar se garantiza estadísticamente la precisión de la clasificación de alelos. La evaluación comprueba la nomenclatura de alelos automática o Allele Calling con la escalera alélica y la concordancia de la clasificación de alelos en comparación con la identificación previa del ADN de prueba mediante otros métodos (otros kits de PCR, secuenciación directa, etc.) mediante el software GeneMapper ID. Mediante estos resultados se han establecido los ajustes del equipo específicos del ensayo para el genotipado a través de electroforesis capilar en gel (bins y paneles) y la proporción de picos stutter para los archivos de plantillas de los equipos de secuenciación de ADN.

**Metodología:** Se han analizado en una sola determinación 80 ADNs identificados previamente de donantes voluntarios procedentes de distintas fuentes (sangre total, pruebas aleatorias). Además, se ha añadido un valor en blanco sin ADN. Como criterios de aceptación se han definido perfiles completos con alturas de picos de  $\geq 50$  RFU (evaluación manual).

**Resultados:** Tras determinar los ajustes del equipo específicos del ensayo se ha podido asignar el genotipo correcto a todas las muestras de ADN para todos los sistemas STR y el marcador amelogenina.

### A c) Evaluación de la especificidad analítica

**Objetivo:** El estudio sirve para excluir los resultados falsos positivos derivados de la reactividad cruzada con muestras de ADN no humano seleccionadas. Sin embargo, en la práctica clínica, el ADN no humano puede excluirse en gran medida sobre la base del muestreo estéril.

**Metodología:** Se han sometido a ensayo 2,5 ng de ADN genómico de *Bos taurus* (bovino), *Sus scrofa domestica* (cerdo doméstico), *Canis lupus familiaris* (perro), *Felis catus* (gato) y *Oryctolagus cuniculus* (conejo doméstico). El ADN de animales procedía de muestras de sangre que se han puesto a disposición como material residual de pruebas veterinarias.

**Resultados:** No se detectó reactividad cruzada en los intervalos de alelos (< 200 RFU).

### A d) Evaluación de la sensibilidad analítica

**Objetivo:** El ensayo se utiliza para determinar el límite de detección analítica (sensibilidad).

**Metodología:** Se sometió a ensayo una serie de diluciones de 500 pg hasta 31,5 pg de ADN de referencia en determinación cuádruple. Los perfiles completos de ADN con  $\geq 200$  RFU se han definido como criterio de aceptación.

**Resultados:** Se ha establecido un límite de detección de 200 pg de ADN genómico.

### A e) Evaluación de distintos termocicladores de PCR

**Objetivo:** Los termocicladores de PCR de distintos fabricantes son diferentes en sus especificaciones. En particular, pueden existir diferentes rampas de enfriamiento y de calentamiento así como diferentes técnicas de control de la temperatura.

**Metodología:** El ensayo de las reacciones estándar con ADN de control en la concentración nominal de 500 pg se ha realizado con los siguientes termocicladores en determinaciones cuádruples con la misma mezcla maestra y 2 muestras ciegas sin ADN: Termociclador *GeneAmp 9700* con bloque de aluminio (Life Technologies, Division Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt) además del equipo *GeneAmp 9700* con bloque de plata (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt), termociclador DNA Engine (PTC-200) Peltier (Bio-Rad Laboratories GmbH, München), *Biometra T1* (Biometra GmbH, Göttingen), termociclador *Techne® TC-512* (biostep GmbH, Jahnsdorf) y *Eppendorf Mastercycler ep-S* (Eppendorf AG, Hamburg).

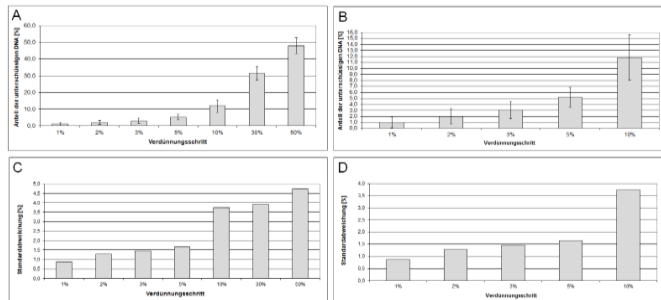
**Resultados:** No se han detectado subproductos no específicos de  $\geq 200$  RFU. La desviación de las alturas de pico medias en comparación con la reacción estándar en un incremento definido fue de 2 °C/s, no superior al 20 %.

## A f) Evaluación de distintas muestras variadas de ADN

**Objetivo:** El objetivo del análisis de quimerismo tras el trasplante de células madre alógicas es la demostración y la cuantificación relativa del ADN del donante y del ADN del receptor. Como prueba de la enfermedad residual mínima, en una muestra compuesta debería llegar a poder detectarse la menor cantidad posible del ADN del donante o del receptor.

**Metodología:** Se han producido tres mezclas independientes a partir de dos ADNs, donde la proporción menor de ADN era de 0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 %. Los ADNs en la mezcla mostraban al menos 3 loci STR con cuatro alelos informativos. Cada 1 ng de la mezcla de ADN se ha probado en la reacción estándar en cuatro recipientes por separado. Se han analizado niveles de señal de al menos 50 RFU.

**Resultados:** Los resultados están representados en la imagen 4. Para el ADN en menor cantidad se ha podido alcanzar un límite de detección del 1 %. Esto se corresponde con los valores 1-5 %, los cuales se logran con kits forenses de STR para el análisis de quimerismo.



**Imagen 4:** Análisis de mezclas de ADN. (A, B) Promedios y variación estándar de las proporciones menores de ADN calculadas a partir de los niveles de señal de la electroforesis capilar en gel. (C, D) Variaciones estándar de A y B.

## A g) Evaluación del efecto de distintas temperaturas de hibridación en la PCR

**Objetivo:** Para determinar la solidez de las PCR, se simulan las variaciones de temperatura del paso de depósito de cebadores (annealing o hibridación) de la PCR múltiple. Este paso de temperatura es crítico para la sensibilidad y especificidad de las PCR.

**Metodología:** La temperatura de hibridación específica del kit de 60 °C de la reacción estándar con ADN de control en la concentración nominal de 500 pg ha variado  $\pm 1$  °C y  $\pm 2$  °C. Se ha realizado una determinación triple con la misma mezcla maestra.

**Resultados:** Para  $\pm 1$  °C no se han detectado subproductos no específicos de  $\geq 200$  RFU. Las alturas del pico promediadas varían en  $\pm 1$  °C, máximo  $\pm 30$  % de la reacción estándar. Para  $\pm 2$  °C no se ha detectado fallo de señal  $< 200$  RFU.

#### A h) Evaluación de distintos lotes de buffer para PCR

**Objetivo:** Los índices de concentración de los componentes en la solución buffer de la PCR de la mezcla de reacción A (dNTPs, concentraciones de iones, en particular  $Mg^{2+}$ ) son determinantes para la sensibilidad, la especificidad y el equilibrio de las señales de la PCR múltiple. Por lo tanto, la solidez del ensayo se prueba en función de las variaciones de lotes de la solución buffer facilitada para la PCR.

**Metodología:** Se han analizado 3 lotes independientes de reacción mixta en la reacción estándar con ADN de control de la concentración nominal de 500 pg.

**Resultados:** No se han detectado subproductos no específicos de  $\geq 50$  RFU. La desviación de las alturas de pico medias en comparación con la reacción estándar no ha superado el 20 %.

#### A i) Análisis de inhibidores de PCR

**Objetivo:** La hematina de la hemoglobina es un potente inhibidor de la ADN polimerasa *Taq*. En el caso de una purificación insuficiente del ADN, esta no puede retirarse completamente de una sangre total estabilizada.

**Metodología:** El impacto de *Hematin porcine* (Sigma-Aldrich, Friburgo) fue analizado a concentraciones finales de 0-250  $\mu M$  en la reacción estándar con ADN de control en la concentración nominal de 500 pg.

**Resultados:** Los perfiles completos ( $\geq 50$  RFU) se obtuvieron hasta una concentración final de inhibidor de 100  $\mu M$  de *Hematin porcine*. A partir de una concentración final de 150  $\mu M$  ya no se pudo alcanzar un perfil completo (subperfiles).

#### A j) Vida útil desde su apertura

**Objetivo:** Se ha probado la estabilidad de los reactivos del kit de PCR tras una congelación y descongelación reiteradas.

**Metodología:** Los reactivos del kit han sido sometidos a 20 ciclos de congelación y descongelación. La congelación se produjo durante al menos 1 h a  $-20$  °C. La congelación se produjo a temperatura ambiente y los reactivos fueron homogeneizados agitándolos antes de su uso. A continuación, en tres determinaciones, se realizó una reacción estándar con ADN de control de una concentración nominal de 500 pg y de blancos adicionales sin ADN. La evaluación se produjo comparando una reacción estándar sin ciclo de congelación y descongelación.



**Resultados:** La desviación de las alturas de pico medias en comparación con la reacción estándar no ha superado el 20 % (especialmente pérdida de la señal). Para los valores en blanco, no se encontraron picos adicionales > 50 RFU dentro de la escala.

## **B Datos del rendimiento clínico**

### **B a) Muestreo y aspectos éticos y normativos**

Se ha llevado a cabo una evaluación del rendimiento con arreglo a los art. 20 a 24 de la Ley alemana sobre productos sanitarios (MPG). El Instituto Federal de Medicamentos y Productos Sanitarios emitió la exención del requisito de autorización para los productos sanitarios de bajo riesgo de conformidad con el art. 7 del Reglamento sobre investigaciones clínicas de productos sanitarios. El comité ético competente adoptó una votación favorable y las declaraciones de los pacientes.

Se utilizó sangre completa venosa heparinizada.

### **B b) Pruebas comparativas**

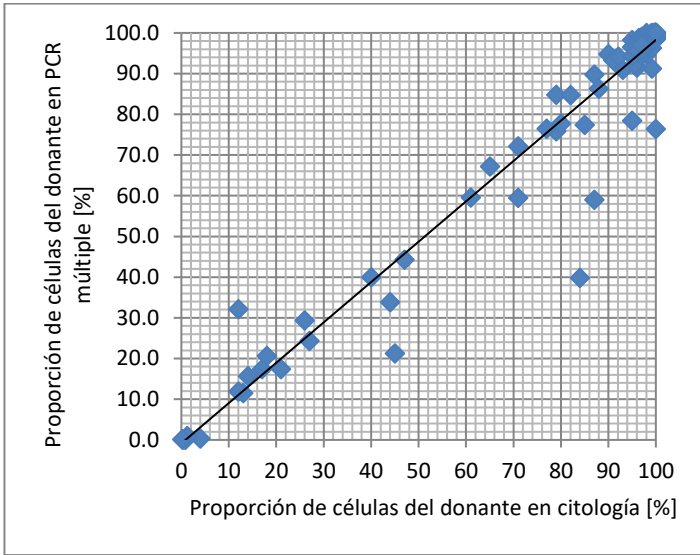
Como prueba comparativa se utilizó la separación citogenética de los leucocitos de donantes y de receptores mediante la hibridación in situ fluorescente (FISH). Se utilizó el kit de muestras de ADN CE-IVD CEP® X SpectrumOrange™ / Y SpectrumGreen™ para el etiquetado fluorescente directo (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, DE) según las indicaciones del fabricante.

### **B c) Extracción de ADN y purificación**

La extracción de ADN de sangre completa heparinizada se realizó con el kit QIAamp® DNA Blood Mini (Qiagen GmbH, Hilden, DE) según las indicaciones del fabricante.

### **B d) Resultados**

Se recogieron en total 103 conjuntos de datos de pacientes adultos en distintos días tras un trasplante de células madre alogénicas o de médula ósea. Las parejas receptor-donante se distinguen en su sexo genético y, por tanto, son adecuadas para el FISH específico de cromosomas sexuales. Por cada PCR se ha utilizado un mínimo de 1,5 ng de ADN genómico. A continuación, se identificaron todos los sistemas de información STR de las parejas receptor-donante y se confirmó el género mediante el genotipado del marcador amelogenina, el cual es parte integrante de la PCR múltiple. Para la evaluación de la PCR se han utilizado los valores promedio de los niveles de señal de todos los STR informativos (al menos 2). Los resultados de las pruebas comparativas se resumen en la imagen 5.



**Imagen 5:** Análisis de concordancia de la PCR múltiple en comparación con la citología.

En 92 de los 103 conjuntos de datos de medición (90,3 %), la desviación de los hallazgos de la PCR múltiple es menor del 5 % de la citogenética. Se observaron desviaciones importantes solo en relación con los resultados citogenéticos en los que el número total de células contadas era inferior o igual a 500. De acuerdo con las recomendaciones del fabricante del kit FISH, deben contabilizarse al menos 200 células. Con arreglo a las recomendaciones prácticas, los recuentos absolutos superiores de células (500-1 000) obtienen mejores resultados citogenéticos [1, 2].

## B e) Referencias

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

**Biotype GmbH**

Moritzburger Weg 67

01109 Dresden

Tel. +49 351 8838 400

Fax +49 351 8838 403

[info@biotype.de](mailto:info@biotype.de)[www.biotype.de](http://www.biotype.de)