

Mentype[®] DIPquant

Instrucciones de uso

**Aplicación de qPCR cuantitativa para la
cuantificación alelo-específica del estado de quimerismo**

Diagnóstico in vitro



DIQIFU01v2es
Junio 2021



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



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
D-01109 DRESDEN
GERMANY

xx* - define el número de artículo específico del locus

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.

En caso de duda o sugerencia estamos a su disposición. Contacte con nosotros o visite nuestra página web www.biotype.de.

Índice de contenido

1. Uso previsto	5
2. Antecedentes	5
3. Descripción del producto Mentype® DIPquant.....	5
3.1 Instrumento de qPCR.....	6
3.2 Tipo de muestra	6
3.3 Sensibilidad/especificidad	6
3.3.1 Rango de medición de quimerismo.....	6
3.3.2 Sensibilidad y especificidad.....	6
4. Advertencias e indicaciones de seguridad.....	9
4.1 Control de calidad.....	9
5. Materiales incluidos	10
5.1 Contenido del kit	10
5.2 Información del pedido.....	10
5.3 Reactivos y utensilios requeridos no incluidos en el kit.....	10
6. Almacenamiento	12
7. Desarrollo del trabajo.....	12
7.1 Descripción del análisis de quimerismo con productos Mentype® DIP	12
7.2 Preparación de muestras y volumen de trabajo de ADN	13
7.2.1 Aislamiento de ADN	13
7.2.2 Empleo de ADN patrón.....	13
7.3 Composición de la mezcla maestra.....	13
7.3.1 Controles positivos	14
7.3.2 Control negativo.....	15
7.4 Volumen de preparación de la reacción.....	15
8. Programa de qPCR y amplificación	16
8.1 Configuración del aparato y parámetros de amplificación	16
8.2 Parámetros de detección	16
8.3 Parámetros de amplificación por qPCR*	16
9. Configuración recomendada del análisis	17
9.1 Cuantificación antes del trasplante (pre-trasplante de médula ósea o pre-HSCT)	17
9.2 Cuantificación tras el trasplante/control (post-HSCT).....	18
10. Evaluación.....	19
10.1 Análisis de datos	19
10.2 Comprobación de los resultados.....	19
11. Cuantificación.....	20
11.1 Cuantificación de las muestras pre-HSCT.....	20
11.2 Cuantificación de las muestras post-HSCT	20
12. Interpretación de resultados inusuales.....	21
12.1 Se detecta una intensidad baja de la señal o ninguna señal	21

12.2 Variación de la potencia de la señal en las réplicas.....	21
12.3 Señales del ensayo específico del receptor en el ADN del donante	22
13. Información del pedido	23
14. Referencias	25
15. Marcas y cláusula de exención de responsabilidad	26
16. Símbolos	27
A Datos analíticos de rendimiento (verificación).....	28
A a) ADN humano	28
A b) Especificidad analítica y límite de blanco (LoB)	28
A c) Sensibilidad analítica y límite de detección (LoD)	28
A d) Rango de medición de los ensayos	29
A e) Comprobación de las variaciones de los lotes y del rendimiento en el LoD	29
A f) Medición en dos días distintos	30
A g) Vida útil desde su apertura.....	31
B Datos del rendimiento clínico.....	32
B a) Aspectos éticos y normativos	32
B b) Preanalítica, aislamiento de ADN y cuantificación de ADN	32
B c) Análisis de concordancia	32
B d) Resultados y discusión.....	33
B e) Referencias.....	35

Mentype[®] DIPquant

1. Uso previsto

Las aplicaciones de Mentype[®] **DIPquant** sirven para el diagnóstico in vitro basado en la técnica PCR en tiempo real (qPCR) a efectos del análisis alelo-específico y cuantitativo de quimerismo molecular tras un trasplante alógeno de médula ósea y de células madre hematopoyéticas utilizando delecciones o inserciones de polimorfismos (llamadas DIPs o INDELS, véase capítulo 14 Referencias).

Las aplicaciones Mentype[®] **DIPquant** están destinadas exclusivamente al uso profesional en laboratorios especializados. El personal debe recibir formación sobre las técnicas de la qPCR y el uso de productos sanitarios para diagnóstico in vitro.

2. Antecedentes

El análisis de quimerismo molecular tras un trasplante alogénico de médula ósea y de células madre hematopoyéticas es esencial para controlar el crecimiento del trasplante o para prevenir un riesgo de rechazo. El análisis de quimerismo molecular se realiza mediante la detección de delecciones e inserciones individuales de polimorfismos del ADN, las cuales resultan muy apropiadas para el análisis mediante la qPCR específica de los alelos en comparación con otros motivos de secuencia de ADN.

Después de la identificación de los loci DIP informativos del paciente y del donante con el kit CE-IVD Mentype[®] **DIPscreen**, se pueden realizar los análisis de quimerismo cuantitativo con el correspondiente ensayo único Mentype[®] **DIPquant**. El formato de ensayo flexible permite tanto el análisis de muestras individuales como grandes cantidades de muestras con un consumo mínimo de material. Dado que la alta sensibilidad de los métodos de la qPCR está ligada a una precisión limitada en el ámbito del quimerismo mixto, se recomienda analizar las muestras con quimerismo mixto utilizando los kits Mentype[®] **DIPscreen** (Directriz sobre el trasplante alogénico de células madre de la Asociación Alemana para el trasplante de médula ósea y de células madre hematopoyéticas (DAG-KBT); Bader *et al.* 2016).

3. Descripción del producto Mentype[®] DIPquant

Con los ensayos individuales alelo-específicos Mentype[®] **DIPquant** se pueden dirigir individualmente 55 alelos DIP así como dos regiones cromosómicas Y (*cf.* Tabla 1). Como referencia (REF) de la cuantificación relativa sirve el gen β -globina. Los parámetros de qPCR se ajustan universalmente, de forma que el análisis de los diferentes ensayos específicos del receptor de Mentype[®] **DIPquant** y varias muestras de pacientes puedan realizarse en paralelo en una tanda de qPCR.

El cálculo de quimerismo se realiza según el método $\Delta\Delta C_p$ [el C_p (*crossing point* o punto de cruce) de los instrumentos de qPCR de Roche Lightcycler[®] se corresponde con el valor

Ct (*cycle threshold* o ciclo umbral) de otros sistemas de qPCR]. Para la cuantificación relativa de quimerismo se requiere la medición en paralelo para el locus específico del receptor del **gen de referencia** β -globina (*house-keeping* o normalizador).

Para calibrar el análisis, el ADN del receptor, aislado antes del trasplante (**calibrador pre-HSCT**), debe ser analizado junto con el ensayo de referencia (β -globina) y el correspondiente ensayo por qPCR específico del receptor (ver capítulo 9.1).

3.1 Instrumento de qPCR

Los ensayos Mentype® **DIPquant** han sido verificados y validados en el Roche Lightcycler® 480, equipo II de sistema de PCR en tiempo real (Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, CH).

La aplicación de los ensayos Mentype® **DIPquant** en otros equipos de qPCR debe ser validada y verificada por el usuario.

3.2 Tipo de muestra

Mentype® **DIPquant** ha sido validado con ADN aislado de sangre total anticoagulada con citrato.

El producto Mentype® **DIPquant** está validado para el uso de 250 ng de ADN por reacción. El uso de cantidades mayores de ADN debe ser validado por el usuario.

3.3 Sensibilidad/especificidad

3.3.1 Rango de medición de quimerismo

Como resultado de la tecnología, el intervalo óptimo de medición de las pruebas de quimerismo con los ensayos qPCR de Mentype® **DIPquant** se sitúa en el 0 % - 12,5 % de la proporción medida de ADN del donante o del receptor en la muestra del paciente (muestra compuesta). En este rango se puede aplicar el ajuste de la qPCR, tal y como se describe en el capítulo 9.2. Para muestras > 12,5 % de proporción medida de ADN del donante o del receptor así como muestras de quimerismo mixto se recomienda incrementar el número de réplicas o hacer uso de la aplicación Mentype® **DIPscreen**.

3.3.2 Sensibilidad y especificidad

El límite de detección y la sensibilidad de los ensayos Mentype® **DIPquant** depende de la calidad y de la cantidad del ADN patrón utilizado. En la Tabla 1 se indica la sensibilidad del marcador alelo-específico Mentype® **DIPquant** en mezcla de ADN. Las mezclas han sido realizadas con 250 ng de ADN; el ADN en cantidad menor era homocigótico para el marcador alelo-específico Mentype® **DIPquant**.

El valor C_p máximo indicado en la Tabla 1 muestra el área hasta la cual pueden medirse específicamente las señales del ensayo correspondiente Mentype® **DIPquant**.

Tabla 1 Límite específico de detección del ensayo Mentype® DIPquant

Sensibilidad y especificidad de los ensayos de Mentype® DIPquant								
Equivalente celular alelo DIP/PCR	5	Valor Cp máx.	10	Valor Cp máx.	20	Valor Cp máx.	80	Valor Cp máx.
Concentración [pg/PCR]	31,5		63		126		500	
Proporción en 250 ng/PCR [%]	0,013		0,025		0,05		0,2	
Ensayo HLD Mentype® DIPquant	23-I	36,7	67-I	37,7	82-I	33,5	79-I	31,1
	38-I	36,3	82-D	33,9	105-D	33,7	152-D	35,5
	48-I	36,5	84-D	38,0	140-I	35,0		
	53-D	37,5	101-I	37,4	301-D	32,5		
	53-I	35,0	103-D	37,2				
	67-D	36,2	104-D	34,1				
	70-D	32,5	131-D	33,6				
	70-I	35,6	131-I	34,2				
	84-I	37,3	305-D	33,9				
	88-D	35,6						
	88-I	31,6						
	91-D	34,1						
	91-I	35,2						
	97-I	36,4						
	101-D	35,7						
	103-I	36,6						
	104-I	35,5						
	105-I	34,5						
	106-D	36,9						
	106-I	34,2						
	110-I	35,6						
	112-I	34,8						
	114-D	35,5						
	114-I	37,4						
	116-D	35,9						
	116-I	34,6						
	128-D	35,4						
	128-I	32,7						
	133-I	35,9						
	134-D	35,3						
	134-I	35,6						
	163-D	35,2						
163-I	35,0							
301-I	35,9							
304-D	36,0							
305-I	35,6							
307-D	35,9							
307-I	37,5							
310-D	36,3							
REF	36,0							
SMCY	36,3							
SRY	36,6							

4. Advertencias e indicaciones de seguridad

Consulte las fichas de seguridad (MSDS) de los productos Biotype® que le enviaremos a petición (support@biotype.de). Para las fichas de seguridad de los reactivos no incluidos en el kit de análisis deberá contactar con el fabricante correspondiente.

Lea detenidamente las instrucciones de uso antes de utilizar el producto.

Cuando reciba el producto y sus componentes, compruebe su integridad en términos de cantidad, tipo y envasado (véase capítulo 5.1), etiquetado correcto, congelación de los reactivos e integridad de los envases de reactivos.

Al realizar los análisis, utilice guantes, bata de laboratorio y, en su caso, gafas de protección.

Evite la contaminación con nucleasas (DNasa/RNasa) de las muestras utilizando puntas de pipeta desechables libres de DNasa/RNasa con filtros para aerosoles.

Utilice zonas de trabajo separadas para la preparación de muestras (pre-PCR), la preparación de la mezcla maestra así como para el tratamiento de muestras y el análisis (post-PCR). Almacene los controles positivos en un lugar separado de los componentes del kit.

Es posible que se requieran otros controles según las directrices o requisitos de las disposiciones locales, municipales o nacionales, o de organizaciones de acreditación.

No utilice componentes del kit cuya fecha de caducidad haya vencido, y no mezcle lotes.

Elimine los desechos de muestras y análisis según las disposiciones de seguridad locales.

Para lote DIP01113 (Reaction Mix D lote CH1900491):

Este kit de análisis contiene las siguientes sustancias potencialmente peligrosas:

Componente del kit	Producto químico	Peligro
Reaction Mix D	Azida de sodio NaN_3	Tóxico al ingerir, en contacto con ácidos produce gases tóxicos

4.1 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 por correo electrónico a través de support@biotype.de en relación con todas las cuestiones relacionadas con el control de calidad.

5. Materiales incluidos

5.1 Contenido del kit

Los kits Mentype® **DIPquant** contienen los siguientes componentes suficientes para la realización de hasta 100 reacciones.

Tabla 2 Tamaños de envases y componentes incluidos en el kit Mentype® **DIPquant**, * solo disponible como ensayo de referencia Mentype® **DIPquant**, # xxx define el número de artículo específico del locus

Etiqueta	Contenido	Volumen por tamaño del envase	
		25 reacciones	100 reacciones*
Nuclease-Free Water	Agua libre de nucleasas	1,5 mL	2 x 1,5 mL
Reaction Mix D	Mezcla de reacción D	125 µL	500 µL
Mentype® DIPquant -HLDxxx#-D/-I Primer Mix -SRY Primer Mix -SMCY Primer Mix -Reference Primer Mix	Mezcla de cebador	63 µL	250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	ADN polimerasa Multi Taq 2	10 µL	40 µL

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.

5.2 Información del pedido

Envíenos por escrito su pedido al correo electrónico sales@biotype.de. El pedido debe especificar los números de pedido conforme a los especificados en la Tabla 3 y Tabla 13, página 23.

Nota: Tenga en cuenta que el tamaño de embalaje 50 para reacciones ya no está a la venta.

Tabla 3 Formato general de los números de pedido del ensayo Mentype® **DIPquant**, * xx define el número de pedido del ensayo específico del locus Mentype® **DIPquant**

Mentype® DIPquant	25 Reacciones	N.º de pedido	45-015xx* -0025 (*cf. Tabla 13)
Mentype® DIPquant Referenz	100 Reacciones	N.º de pedido	45-01591-0100

5.3 Reactivos y utensilios requeridos no incluidos en el kit

El siguiente kit está disponible, a escoger ensayos informativos específicos de donante y paciente Mentype® **DIPquant** en una PCR múltiple:

Tabla 4 Información del pedido del kit de genotipado Mentype® **DIPscreen**, * yyy define el tamaño del envase

Reactivo	Proveedor	Número de pedido
Mentype® DIPscreen (genotipado)	Biotype GmbH	45-45410-0yyy*

Nota: Los sitios de unión de los cebadores del ensayo Mentype® **DIPquant** difieren de los del kit Mentype® **DIPscreen**. En casos excepcionales, las mutaciones que se produzcan en los sitios de unión de los cebadores pueden generar una pérdida de alelos (allelic dropouts). Como consecuencia, pueden aparecer diferencias genotípicas entre los ensayos Mentype® **DIPquant** y Mentype® **DIPscreen**. Por ello, los resultados de Mentype® **DIPscreen** siempre deben ser verificados mediante ensayos informativos Mentype® **DIPquant** preseleccionados antes de ser utilizados en el control de quimerismo (véase también capítulo 9.1, cuantificación pre-trasplante – pre-HSCT).

En el caso de la amplificación de qPCR, se requieren los siguientes materiales e instrumentos:

- Equipo adecuado para la PCR en tiempo real (*cf.* capítulo 3.1)
- Kit adecuado para extracción de ADN (*cf.* capítulo 7.2.1)
- Equipo adecuado para la medición cuantitativa de la concentración de ADN tras extracción y purificación (*cf.* capítulo 7.2.1)
- Centrífuga de mesa con un rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Placas de 96 pocillos o tubos de reacción; si se utilizan placas de 96 pocillos se requieren tapas o láminas adecuadas y una centrífuga con rotor para placas
- Vórtex adecuado para placas de 96 pocillos o tubos de reacción
- Pipetas, puntas de pipeta con filtro (desechables)
- Guantes desechables sin polvo

Nota: Asegúrese de que todos los aparatos han sido instalados, inspeccionados y calibrados según las indicaciones del fabricante. Cerciórese de que todos los reactivos están disponibles para el funcionamiento del equipo de qPCR correspondiente (véase instrucciones de uso del fabricante del aparato correspondiente).

6. Almacenamiento

El envío de los ensayos Mentype® **DIPquant** se realiza en hielo seco. Los componentes del ensayo llegan congelados. En el caso de que uno o más componentes no estén congelados en su recepción o los tubos resulten dañados durante el transporte deberá ponerse en contacto con Biotype GmbH (support@biotype.de).

Los componentes deben almacenarse a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C. Debe evitarse la descongelación y la congelación repetidas. No debe superarse el número máximo de 8 ciclos de descongelación-congelación.

Los kits Mentype® **DIPquant** deben almacenarse protegidos de la luz.

El período de validez del kit de análisis figura en la etiqueta del envase.

7. Desarrollo del trabajo

7.1 Descripción del análisis de quimerismo con productos Mentype® DIP

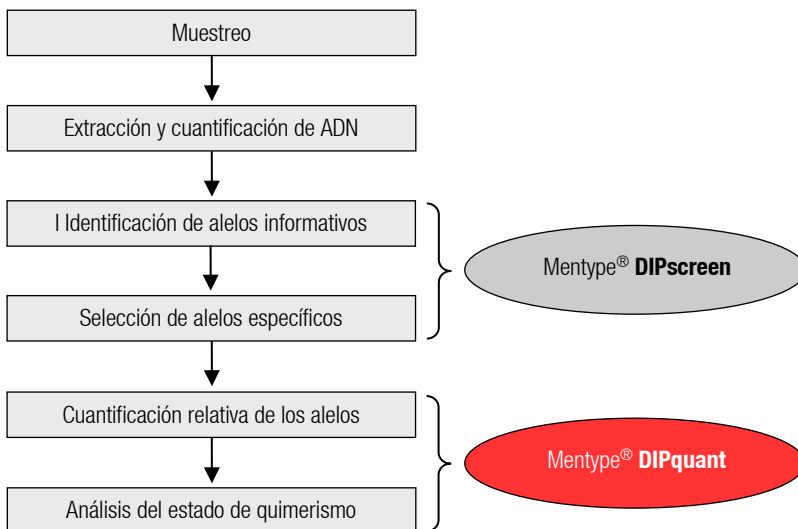


Imagen 1 Desde el muestreo hasta el análisis - el análisis de quimerismo con las aplicaciones Mentype® **DIPscreen** y Mentype® **DIPquant**

7.2 Preparación de muestras y volumen de trabajo de ADN

7.2.1 Extracción de ADN

La calidad del ADN aislado es determinante para el rendimiento y la calidad de todo el sistema de análisis. Se debe garantizar que el sistema utilizado para el aislamiento de ADN sea compatible con la tecnología de qPCR.

Los siguientes kits sirven para el aislamiento de ADN:

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

Asimismo se pueden utilizar kits alternativos de aislamiento de ADN, pero su idoneidad debe ser validada por el usuario.

Nota: Para resultados exactos es necesaria la cuantificación de ADN (p. ej. mediante cuantificación de ADN por espectrofotometría ultravioleta-visible a 260 nm y determinación de la calidad mediante relación A260 / A280, la cual debería situarse entre 1,7 y 2,0).

7.2.2 Empleo de ADN patrón

La mezcla de cebador alelo-específica está optimizada para el empleo de 250 ng de ADN purificado, el cual se corresponde con 41 666 células (6 pg de ADN / célula). Para un resultado óptimo se recomienda utilizar 250 ng de ADN.

7.3 Composición de la mezcla maestra

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

El volumen de ADN que vaya a utilizarse viene determinado por su concentración. Para obtener resultados óptimos debería ajustarse una cantidad de ADN de 250 ng por reacción.

El volumen total de preparación para PCR debería ser siempre 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.

El siguiente resumen muestra los volúmenes de los componentes del kit utilizados con 5,0 µL de volumen de muestra (ADN patrón) y un volumen de reacción de 25 µL.

Tabla 5 Preparación de mezcla maestra para una reacción Mentype® **DIPquant** utilizando 5 µL de ADN

Componentes	Volumen por preparación de qPCR
Nuclease-Free Water	12,1 µL
Reaction Mix D*	5,0 µL
Mentype® DIPquant Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Volumen total de la mezcla maestra	20,0 µL
Patrón de ADN (50 ng/µL)	5,0 µL

* contiene Mg²⁺, dNTPs, BSA

Nota: Almacene el ADN diluido en 1 x TE (10 mM Tris HCl, pH 8,0 y 1 mM EDTA) p 0,1 x TE o agua libre de nucleasas.

7.3.1 Controles positivos

Para el control positivo utilice, en lugar de 5 µL de ADN patrón, p. ej. un ADN de control previamente identificado específico del alelo (5 ng/µL). Pipetee el ADN de control en lugar del ADN patrón en el recipiente de reacción con la mezcla maestra para la qPCR.

El siguiente resumen muestra los volúmenes de los componentes del kit utilizados con 5,0 µL de ADN de control y un volumen de reacción de 25 µL.

Tabla 6 Preparación de mezcla maestra para una reacción Mentype® **DIPquant** utilizando 5 ng/µL de ADN de muestra de control positivo

Componentes	Volumen por preparación de qPCR
Nuclease-Free Water	12,1 µL
Reaction Mix D*	5,0 µL
Mentype® DIPquant Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Volumen total de la mezcla maestra	20,0 µL
ADN de control (5 ng/µL)	5,0 µL

* contiene Mg²⁺, dNTPs, BSA

7.3.2 Control negativo

Como control negativo pipetee 5 µL de agua libre de nucleasas en lugar del ADN patrón en el recipiente de reacción con la mezcla maestra para la qPCR.

El siguiente resumen muestra los volúmenes de los componentes del kit utilizados con 5,0 µL de “agua libre de nucleasas” y un volumen de reacción de 25 µL.

Tabla 7 Preparación de mezcla maestra para una reacción Mentype® DIPquant

Componentes	Volumen por preparación de qPCR
Nuclease-Free Water	12,1 µL
Reaction Mix D*	5,0 µL
Mentype® DIPquant Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Volumen total de la mezcla maestra	20,0 µL
Agua libre de nucleasas	5,0 µL

* contiene Mg²⁺, dNTPs, BSA

7.4 Volumen de preparación de la reacción

Pipetee 20 µL de la mezcla maestra de qPCR en el recipiente de reacción (tubos ópticos) o en la placa de microtitulación. A continuación, añada 5 µL del ADN específico (*cf.* esquema de pipeteo en capítulos 9.1 y 9.2), o 5 µL de controles positivo y negativo.

Si fuera posible, se deberían utilizar placas de PCR o recipientes de reacción blancos para el equipo de qPCR, ya que de este modo se logra una detección eficaz de las señales de fluorescencia. Mediante la detección mejorada de la fluorescencia, la sensibilidad del ensayo puede aumentar.

Tras el pipeteo, debería tapar los recipientes de reacción o las placas de microtitulación (tapones ópticos, sellado óptico).

Centrifugue la reacción brevemente e introdúzcala en el equipo para su análisis.

8. Programa de qPCR y amplificación

8.1 Configuración del aparato y parámetros de amplificación

Genere el protocolo para la amplificación por qPCR y para la detección con los parámetros expuestos. En las instrucciones de uso del fabricante del equipo encontrará la configuración específica del aparato. De lo contrario, contacte con nuestro servicio de asistencia técnica (support@biotype.de).

8.2 Parámetros de detección

6-FAM sirve como colorante de fluorescencia marcador para todos los ensayos. Preste atención a la selección del conjunto correcto de filtros en el software del equipo de PCR en tiempo real.

8.3 Parámetros de amplificación por qPCR*

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

Tabla 8 Parámetros de amplificación para qPCR para la ejecución del ensayo de Mentype® DIPquant

Temperatura	Tiempo	
94 °C	4 min (arranque en caliente para la activación de la ADN polimerasa Multi Taq2)	
94 °C	30 s	45 ciclos
62 °C	45 s	

* Validado con el Roche Light Cycler® LC480 (con rampas de calentamiento estándar de aprox. 4,4 °C/s y de enfriamiento de 2,2 °C/s).

La toma de datos debería realizarse durante la fase de hibridación y de elongación a 62 °C.

Genere una lista de muestras (sample sheet) con los ajustes seleccionados.

9. Configuración recomendada del análisis

Para lograr el rango de medición óptimo de la qPCR se debería medir la proporción del receptor en la muestra compuesta (*cf.* capítulo 3.3.1)

Para la cuantificación relativa del quimerismo se recomienda la aplicación del ensayo de qPCR según el siguiente esquema:

- **3 alelos específicos del receptor distintos** (alelos de interés, AOI) por **duplicado** (véase Tabla 9, tabla 12, tabla 13), **o**
- **2 alelos específicos del receptor distintos** (alelos de interés, AOI) por **triplicado** (véase Tabla 10)
- Por ADN y momento se debe realizar la **referencia activa** (REF, β -globina) al menos por **duplicado** (mejor por triplicado)
- por ensayo, un **control negativo (NC)** y un **control positivo (PC)**

Tabla 9 Configuración 1: Ejecución de 3 Mentype® **DIPquant** específicos por duplicado y del ensayo de referencia Mentype® **DIPquant** por triplicado

Ensayo	Réplica	Número de loci analizados
Ensayos específicos DIPquant	2	3
Ensayo de referencia (β -globina)	3	-

Tabla 10 Configuración 2: Ejecución de 2 Mentype® **DIPquant** específicos por triplicado y del ensayo de referencia Mentype® **DIPquant** por triplicado

Ensayo	Réplica	Número de loci analizados
Ensayos específicos DIPquant	3	2
Ensayo de referencia (β -globina)	3	-

9.1 Cuantificación antes del trasplante (pre-trasplante de médula ósea o pre-HSCT)

De forma previa al trasplante (calibrador pre-HSCT), el ADN del receptor aislado debe ser analizado junto con el ensayo de referencia (gen β -globina) y el correspondiente ensayo por qPCR específico del receptor. El valor de esta cuantificación se establece como 100 % de proporción del receptor.

Para asegurarse de la especificidad del ensayo por qPCR específico del receptor se debe realizar un análisis del ADN del donante. Esto se corresponde con el 0 % de proporción del receptor.

Tabla 11 Ejemplo para la configuración de una placa Multiwell antes del trasplante (calibrador pre-HSCT)

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

Ref: Ensayo de referencia; AOI 1-3: Ensayo específico del receptor; preTx: Muestra del receptor como calibrador; Donante*: Muestra del donante opcional como prueba de especificidad; NTC: No Template Control o sin patrón de control; PC: Control Positivo

9.2 Cuantificación tras el trasplante/control (post-HSCT)

El control de quimerismo debería realizarse con ADN del paciente recién aislado en los momentos de control correspondientes. Para un análisis seguro debería añadirse la referencia, tres alelos específicos del receptor así como controles positivos y negativos (véase Tabla 13).

Tabla 12 Ejemplo para la configuración de una placa Multiwell después del trasplante (control)

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

Ref: Ensayo de referencia; AOI 1-3: Ensayos específicos del receptor; Control 1: Primera muestra de control después del trasplante; NTC: No Template Control o sin patrón de control; PC: Control Positivo;

10. Evaluación

10.1 Análisis de datos

Considere las curvas de amplificación del ciclo de qPCR completo. El proceso detallado del análisis de datos sin procesar depende del equipo utilizado de PCR en tiempo real.

La definición del valor umbral “baseline noise levels” debería realizarse automáticamente, o bien predefinirse en el ciclo determinado (p. ej. 3-15). Utilice **NTC** para calcular el valor umbral correspondiente.

Dado que $\Delta\Delta C_p$ se utiliza para la cuantificación, los valores fijados individualmente para el umbral no tienen ninguna repercusión en los resultados, siempre que se analicen todos los ensayos realizados sobre una muestra con el mismo valor umbral.

Para la exportación de datos y el tratamiento de datos, consulte el manual del fabricante del dispositivo en tiempo real. Exporte la prueba denominada “Sample name” y los valores C_p para los cálculos posteriores.

10.2 Comprobación de los resultados

La qPCR es válida cuando los valores C_p del control positivo se corresponden con los valores mostrados en la Tabla 1 y el control negativo no presenta una amplificación < 45 ciclos.

Utilizando ADN de donantes para el control de la especificidad del ensayo no se debería detectar ninguna señal por debajo de los límites especificados en la Tabla 1.

11. Cuantificación

Si analiza manualmente los datos, utilice el método de cuantificación relativo. Los valores umbral fijados individualmente durante el análisis de datos sin procesar no tienen ninguna repercusión en la cuantificación mediante $\Delta\Delta C_p$ siempre que todos los ensayos realizados sobre una muestra sean analizados con el mismo valor umbral.

Utilice **NTC**, para calcular los valores umbral correspondientes.

Cálculo

11.1 Cuantificación de las muestras pre-HSCT

1. Calcule los valores C_p individuales para la referencia (REF) y los alelos informativos "alelos de interés" (AOI) para el ADN del receptor
2. Calcule el ΔC_p para cada AOI para el REF ($\Delta C_p C = C_p AOI - C_p REF$)
3. ΔC_p indica el valor del calibrador ($\Delta C_p C$) en el cálculo post-HSCT (100 % receptor)

11.2 Cuantificación de las muestras post-HSCT

1. Calcule los valores C_p individuales para la referencia (REF) y los alelos informativos "alelos de interés" (AOI) para el ADN del paciente
2. Calcule el ΔC_p para cada AOI para el REF ($\Delta C_p C = C_p AOI - C_p REF$)
3. Este valor ΔC_p se utiliza para el cálculo del estado desconocido ($\Delta C_p U$)
4. Calcule $\Delta\Delta C_p$ para la cuantificación del quimerismo ($\Delta\Delta C_p = \Delta C_p U - \Delta C_p C$)
5. Calcule el porcentaje de los componentes del receptor dependiendo de la eficiencia de la qPCR; % receptor = $((1+E)^{-\Delta\Delta C_p}) \times 100$. Si la eficiencia de la qPCR es 100 % utilice la siguiente fórmula: $(2^{-\Delta\Delta C_p}) \times 100$.

12. Interpretación de resultados inusuales

12.1 Se detecta una intensidad baja de la señal o ninguna señal

Uno o varios componentes no han sido añadidos a la reacción: Compruebe la amplificación de los controles positivos y, cuando proceda, repita la qPCR.

Para el análisis se ha utilizado el ensayo erróneo: Asegúrese de que los ensayos específicos de los alelos son compatibles con los alelos específicos del receptor.

Condiciones deficientes de la qPCR: Compruebe la configuración de la qPCR. Asegúrese de que la activación de la ADN polimerasa Multi Taq 2 se ha producido a 94 °C durante 4 min. Compruebe la temperatura de hibridación y de elongación, y asegúrese de que la rampa de calentamiento del aparato esté configurada en 4 °C/s y de que la rampa de enfriamiento esté configurada en 2 °C/s.

La qPCR se inhibe: Los inhibidores de la PCR no fueron completamente purificados con la extracción de ADN. Asegúrese de que la purificación de ADN se ha realizado con éxito según las indicaciones del fabricante del kit. Purifique de nuevo el ADN o diluya el patrón. Repita la qPCR con ADN purificado o diluido.

Ha fallado la recogida de datos: Asegúrese de que la recogida de datos de fluorescencia se ha realizado en el momento y en el canal de fluorescencia correctos. Compruebe la configuración de su equipo para los colores de fluorescencia utilizados en el ensayo (6-FAM y ROX).

Problemas con el punto de referencia o con el valor umbral: Fije el valor umbral por encima del fondo inespecífico para obtener valores C_p exactos. Para ello, utilice el procedimiento descrito en el manual del fabricante de su equipo de PCR. Cuando sea posible, realice manualmente los ajustes para el punto de referencia y el valor umbral.

Degradación de los patrones de ADN: Puede producirse una degradación del ADN durante la preparación de la muestra y durante el almacenamiento. Almacene el ADN en 1 x o 0,1 x TE o agua libre de nucleasas. Utilice el ADN de control para comprobar el comportamiento general del ensayo.

Degradación de los componentes de la qPCR: Supervise la durabilidad de los componentes utilizados así como las condiciones de almacenamiento. Evite que la congelación y descongelación de la mezcla de cebadores sea > 8 ciclos y asegúrese de que el almacenamiento de los componentes se efectúa entre -25 °C y -15 °C.

12.2 Variación de la potencia de la señal en las réplicas

Error de pipeteo: Evite errores de pipeteo revisando regularmente su pipeta.

Variaciones en la mezcla maestra: Añada 1-2 reacciones extra al realizar la composición de la mezcla maestra para compensar los errores de pipeteo. Mezcle cuidadosamente los

componentes con el vórtex y centrifúguelos brevemente (10 s). No pipetee menos de 5 µL de ADN patrón.

La qPCR se inhibe: Durante el aislamiento de ADN, los inhibidores de la PCR no fueron completamente purificados. Asegúrese de que la purificación se ha realizado con éxito en el momento del aislamiento de ADN siguiendo las indicaciones del fabricante. Purifique de nuevo el ADN o diluya el patrón. Repita la qPCR con ADN purificado o diluido.

Ha habido un error al establecer el punto de referencia o el valor umbral: Fije el valor umbral por encima del fondo inespecífico para obtener valores C_p exactos. Para ello, utilice el procedimiento descrito en el manual del fabricante de su equipo de qPCR. Cuando sea posible, realice manualmente los ajustes para el punto de referencia y el valor umbral.

Sensibilidad baja: El uso de cantidades muy pequeñas de ADN (cantidad óptima 250 ng) puede reducir la sensibilidad y la reproducibilidad en los replicados. Cuantifique el ADN utilizado según la recomendación del capítulo 7.2.1.

Señales en el control negativo: Para evitar contaminaciones, utilice puntas de pipeta estancas a aerosoles / puntas con filtro o tubos con tapón de rosca. Realice una nueva qPCR con el agua libre de nucleasas utilizada. Almacene los reactivos pre-PCR y post-PCR por separado. Siempre que sea posible, pipetee la reacción y el ADN en espacios diferentes.

12.3 Señales del ensayo específico del receptor en el ADN del donante

Utilización de cantidades demasiado grandes (> 250 ng) de ADN patrón: Reduzca la cantidad de ADN patrón a 250 ng. Antes de realizar el ensayo se debe determinar la concentración de ADN.

Aparición de señales de falso negativo: En casos raros puede ocurrir la pérdida de alelos debido a una mutación en los lugares de unión del cebador. Del genotipado con Mentype® **DIPscreen** podrían obtenerse resultados falsos negativos (cf. capítulos 5.3, 9.1). Debido a que los lugares de unión de los cebadores del ensayo de Mentype® **DIPquant** difieren de los de Mentype® **DIPscreen**, en la qPCR se pueden amplificar no obstante señales positivas específicas del alelo.

13. Información del pedido

Tabla 13 Información del pedido detallada del ensayo específico de alelos Mentype® **DIPquant**, * también disponible en envase de 100 reactivos (45-01591-0100)

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

HLD112-I	45-01516-0025
HLD114-D	45-01517-0025
HLD114-I	45-01518-0025
HLD116-D	45-01519-0025
HLD116-I	45-01520-0025
HLD128-D	45-01523-0025
HLD128-I	45-01524-0025
HLD131-D	45-01525-0025
HLD131-I	45-01526-0025
HLD133-I	45-01528-0025
HLD134-D	45-01529-0025
HLD134-I	45-01530-0025
HLD140-I	45-01532-0025
HLD152-D	45-01533-0025
HLD163-D	45-01535-0025
HLD163-I	45-01536-0025
HLD301-D	45-01539-0025
HLD301-I	45-01540-0025
HLD304-D	45-01541-0025
HLD305-D	45-01543-0025
HLD305-I	45-01544-0025
HLD307-D	45-01545-0025
HLD307-I	45-01546-0025
HLD310-D	45-01549-0025

14. Referencias

- Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, Lamy T, Le Prise PY, Beauplet A, Bories D, Semana G, Quelvennec E, (2002)** Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 99, 4618-4625.
- Bader P, Bornhäuser M, Grigoleit U, Kröger N, (2016)** Leitlinien zur allogenen Stammzelltransplantation (SZT) von der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantationen (DAG-KBT), Kapitel X: Monitoring nach allogener SZT – Chimärismusanalyse und Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) https://www.dag-kbt.de/files/downloads/Leitlinien_Kap-10_Monitoring%20nach%20allogener%20SZT.pdf.
- Chen DP, Tseng CP, Wang WT, Wang MC, Tsai SH, Sun CF (2011)** Real-time biallelic polymorphism-polymerase chain reaction for chimerism monitoring of hematopoietic stem cell transplantation relapsed patients. *Clin Chim Acta* 412, 625-630.
- Harries LW, Wickham CL, Evans JC, Rule SA, Joyner MV, Ellard S (2005)** Analysis of haematopoietic chimaerism by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bone Marrow Transplant* 35, 283-290.
- Masmas TN, Madsen HO, Petersen SL, Ryder LP, Svejgaard A, Alizadeh M, Vindelov LL (2005)** Evaluation and automation of hematopoietic chimerism analysis based on real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biol Blood Marrow Transplant* 11, 558-566.
- Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, Devine SE (2006)** An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human Genome. *Genome Res* 16, 1182-1190.
- Qin XY, Li GX, Qin YZ, Wang Y, Wang FR, Liu DH, Xu LP, Chen H, Han W, Wang JZ, Zhang XH, Li JL, Li LD, Liu KY, Huang XJ (2011)** Quantitative assessment of hematopoietic chimerism by quantitative real-time polymerase chain reaction of sequence polymorphism systems after hematopoietic stem cell transplantation. *Chin Med J (Engl.)* 124, 2301-2308.
- Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G (2002)** Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet* 71, 854-862.
- Wilhelm J, Reuter H, Tews B, Pingoud A, Hahn M (2002)** Detection and quantification of insertion/deletion variations by allele-specific real-time PCR: application for genotyping and chimerism analysis. *Biol Chem* 383, 1423-1433.

15. Marcas y cláusula de exención de responsabilidad

Las denominaciones registradas, marcas comerciales, etc., que se utilizan en el presente documento, aunque no se identifiquen específicamente como tales, se considerarán protegidas: Biotype®, Mentype® (Biotype GmbH); LightCycler® (Roche Diagnostics International AG); QIAamp® (QIAGEN GmbH); NucleoSpin® (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG); FAM™, ROX™ (Life Technologies Ltd.).

Los ensayos Mentype® **DIPscreen** y Mentype® **DIPquant** son kits con el marcado CE, con arreglo a la Directiva europea 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Los kits no están disponibles como productos para el diagnóstico in vitro fuera de este ámbito.

16. Símbolos



Fabricante



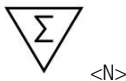
Referencia a elFU



Número de pedido



Diagnóstico in vitro



Suficiente para <N> ensayos



Fecha de caducidad



Límite de temperatura



Mantener seco



Proteger de la luz



Código del lote

Verificación y validación del kit de amplificación para qPCR de Mentype® DIPquant

A Datos analíticos de rendimiento (verificación)

A a) ADN humano

Para todos los experimentos de verificación se ha utilizado un biobanco de más de 100 muestras de ADN humano creadas a partir de sangre venosa anticoagulada con EDTA. Las muestras procedían de voluntarios sanos no emparentados que dieron su consentimiento por escrito. Para preanalítica, aislamiento de ADN y cuantificación de ADN véase capítulo B b).

A b) Especificidad analítica y límite de blanco (LoB)

Objetivo: El producto consta de 57 ensayos para marcadores bialélicos autosómicos, dos marcadores Y y el gen de referencia. La especificidad del ensayo Mentype® **DIPquant** específico del alelo y del cromosoma Y se garantizará en presencia de un excedente definido del alelo alternativo o del cromosoma X.

Metodología: Los datos de qPCR en tiempo real de controles sin patrón (NTC, $n \geq 12$), controles con 250 ng de ADN homocigótico para el alelo alternativo o 250 ng de ADN femenino (en el caso de marcadores específicos de Y) ($n \geq 9$), que no deban ser detectados, han sido recogidos para cada ensayo de qPCR Mentype® **DIPquant**.

Resultados: Ningún NTC mostró una señal falso positivo antes de 45 ciclos. En el caso de 250 ng de ADN homogéneo para el alelo alternativo o el ADN femenino, 26 ensayos de qPCR de Mentype® **DIPquant** no mostraron ninguna señal antes de 45 ciclos. Las otras pruebas mostraron señales inespecíficas antes de 45 ciclos. No obstante, se observó una distribución estocástica entre 1 y 6 falsos positivos en 9 mediciones paralelas. Por lo tanto, se utilizó el enfoque analítico no paramétrico para calcular el LoB (CSLI 2012, datos no mostrados).

A c) Sensibilidad analítica y límite de detección (LoD)

Objetivo: Los experimentos se realizaron para determinar el límite de detección analítica (LoD) de todos los ensayos de qPCR.

Metodología: El cálculo para determinar si el LoD cumple el criterio de calidad para excluir resultados falsos positivos se ha realizado utilizando la ecuación $LoB - (LOD + 2 \times \delta) \geq 2$, donde LoB es el valor de Cp, que según el punto A a) se determina de forma no paramétrica; LOD es el valor Cp medio de las mediciones positivas; y δ es la desviación estándar de LoD. Las mezclas de ADN han sido creadas para todas las pruebas específicas del alelo utilizando 250 ng de ADN homocigótico para el alelo alternativo o 250 ng de ADN femenino (en el caso de marcadores específicos de Y) por PCR y distintas cantidades de ADN homocigótico del alelo a detectar. El número de repeticiones es de 6 (3 en dos días distintos).

Resultados: Primero se añadieron 31,5 pg de ADN del alelo a identificar (que corresponden al 0,01 % del alelo mínimo) del ADN de referencia. Se realizaron otros experimentos con 63 pg (0,025 % alelo mínimo), 126 pg (0,05 % alelo mínimo) o 500 pg (0,2 % alelo mínimo) cuando no se alcanzó el criterio de aceptación de calidad. Los resultados de todos los ensayos de qPCR están representados en la tabla 1.

A d) **Rango de medición de los ensayos**

Objetivo: Se ha determinado el rango de medición lineal de los ensayos.

Metodología: Los experimentos abarcaron todos los datos de A b) y A c). Además, se utilizó una serie de diluciones en serie de plásmidos recombinantes que codifican los alelos a detectar para medir entre 5 y 5 120 copias por reacción. En total se realizaron 11 diluciones, incluyendo los controles sin patrón (NTC) y el número de repeticiones fue de 6 (3 en dos días distintos).

Resultados: Se definió un intervalo de medición lineal de $24 \leq Cp \leq LOD$ para todos los ensayos. Un valor Cp de 24 con 5 120 copias del alelo objetivo se corresponde con el 12,5 % el ADN en cantidad menor en una mezcla con un total de 250 ng de ADN por reacción.

A e) **Comprobación de las variaciones de los lotes y del rendimiento en el LoD**

Objetivo: Los índices de concentración de los componentes en la solución buffer de la PCR de la mezcla de reacción D de la ADN polimerasa Multi Taq 2 son determinantes para la sensibilidad, la especificidad y el equilibrio de las señales de la qPCR. Se comprobó el impacto de las variaciones de los lotes de estos componentes del kit.

Metodología: Se prueban cuatro lotes de mezcla de reacción D y tres lotes de ADN polimerasa MultiTaq2. Los ensayos Mentype® **DIPquant** HLD53-I, Mentype® **DIPquant** HLD84-I, Mentype® **DIPquant** HLD101-I, Mentype® **DIPquant** HLD70-D y Mentype® **DIPquant** HLD88-D se utilizaron como ejemplo para las mediciones. La qPCR se realizó en condiciones estándar con ADN de control (General Positive Control, Biotype GmbH) en dos concentraciones diferentes (50 pg por reacción de PCR y 5 ng por reacción de PCR). Para cada concentración se realizaron tres pruebas paralelas. Además, se utilizaron tres blancos (NTCs) por prueba DIPquant y por lote.

Resultados: Los resultados están representados tanto en la Tabla 14 como en la Tabla 15.

Tabla 14 Variación entre cuatro lotes de mezcla de reacción D

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

Tabla 15 Variación entre tres lotes de ADN polimerasa Multi Taq2

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

A f) **Medición en dos días distintos**

Objetivo: Se llevaron a cabo mediciones en dos días diferentes para mostrar el impacto del pipeteo sobre el rendimiento del ensayo de dos mezclas maestras independientes y del aparato.

Metodología: Para la simulación de posibles errores en el pipeteo por parte del usuario se compararon variaciones de volumen de $\pm 10\%$ de buffer para PCR y Multi Taq 2 con la reacción estándar en 3 ensayos de qPCR de rendimiento potente y en 3 ensayos de qPCR de rendimiento deficiente. La qPCR se realizó en condiciones estándar con ADN de control (General Positive Control, Biotype GmbH) en dos concentraciones diferentes (50 pg por reacción de PCR y 5 ng por reacción de PCR). Para cada concentración se realizaron tres pruebas paralelas. Además, se utilizaron tres valores blancos (NTCs) por ensayo DIPquant y por lote.

Resultados: Los posibles errores en el pipeteo en una variación de volumen de $\pm 10\%$ no poseen ningún impacto sobre el rendimiento del ensayo seleccionado Mentype® **DIPquant** con 5 ng de GPC. En todos los ensayos y para cada error de pipeteo simulado se cumplió el criterio de aceptación. No se produce ningún error y no se detectó ningún subproducto específico.

Utilizando 50 pg de GPC por reacción son posibles más variaciones de > 2 Cp. Por tanto, es obligatorio utilizar productos calibrados, como pipetas.

A g) Vida útil desde su apertura

Objetivo: Se ha probado la estabilidad de los reactivos del kit de qPCR tras una congelación y descongelación reiteradas. Esto ilustrará la utilización rutinaria del producto en un procedimiento simulado (acelerado).

Metodología: A modo de ejemplo se eligieron cuatro ensayos Mentype® **DIPquant**. Las sondas del cebador han sido sometidas a 8 ciclos de congelación y descongelación. La congelación se produjo durante al menos 30 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La congelación se produjo a temperatura ambiente y los reactivos fueron homogeneizados agitándolos antes de su uso. A continuación se realizó una reacción estándar. Para poder evitar un impacto adicional utilizando distintos ADNs se utilizó el ADN de control (GPC). Para el análisis se utilizaron dos concentraciones diferentes de ADN (50 pg por reacción de PCR y 5 ng por reacción de PCR). Para cada concentración se realizaron tres pruebas paralelas. Además, por cada ensayo Mentype® **DIPquant** se añadieron tres NTCs.

Resultados: La congelación y descongelación frecuentes no poseen un impacto negativo sobre el rendimiento del ensayo DIPquant. La detección mediante la mezcla de sondas de cebadores también es posible con 8 ciclos de congelación y descongelación. Los valores Cp se ven modificados mínimamente. La divergencia ocurre en el ámbito de la variación del aparato del ciclador de qPCR.

B Datos del rendimiento clínico

B a) Aspectos éticos y normativos

Se ha llevado a cabo una evaluación del rendimiento con arreglo a los art. 20 - 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 protocolo fue autorizado por la comisión ética local de un centro de estudios clínicos. Todos los participantes eran adultos, *sui juris*, y dieron su consentimiento por escrito.

B b) Preanalítica, aislamiento de ADN y cuantificación de ADN

Se utilizaron muestras de sangre venosa anticoagulada en EDTA (p. ej. S-Monovette K2E, Sarstedt AG & Co. KG, Nuembrecht, DE). El aislamiento de ADN a partir de sangre total se realizó con el kit DNA Blood Mini de QiAamp® (Qiagen GmbH, Hilden, DE) según las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de ADN se determinaron mediante espectroscopia ultravioleta-visible a 260 nm.

B c) Análisis de concordancia

Todos los pacientes recibieron un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas de sexo mixto, y el genotipado se llevó a cabo mediante hibridación in situ fluorescente (FISH), utilizando kits de sondas de ADN de etiquetado fluorescente directo específicos de losomas CE-IVD CEP® X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen™ (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, DE). El análisis de quimerismo basado en PCR se realizó con Mentype® **DIPquant** (qPCR), Mentype® **DIPscreen** (Biotype GmbH), una PCR múltiple en combinación con electroforesis capilar en gel utilizando un analizador genético ABI Prism® 3100 (Applied Biosystems, Carlsbad, US-CA); así como Mentype® **Chimera**® (Biotype GmbH), una PCR múltiple combinada con electroforesis capilar en gel utilizando un analizador genético ABI Prism® 3100. Al utilizar el kit Mentype® **DIPquant** se añadieron 250 ng de ADN por reacción. Todos los kits fueron utilizados según las instrucciones de uso del fabricante.

B d) Resultados y discusión

En primer lugar, se determinaron todos los sistemas de información DIP y STR de las parejas donante-receptor. Además, se confirmó el sexo mediante el genotipado con el marcador amelogenina, el cual también es un componente de Mentype® **DIPscreen** y Mentype® **Chimera**®. En total se extrajeron 54 muestras de sangre anticoagulada en EDTA de 6 pacientes en distintos días tras el trasplante de células madre hematopoyéticas. Se utilizó el valor medio de todos los biomarcadores de información STR y DIP (2-7) para el análisis de quimerismo en el genotipado por PCR múltiple en combinación con electroforesis capilar en gel. En el caso del ensayo de Mentype® **DIPquant** se seleccionaron tres ensayos informativos de qPCR y el gen de referencia según el capítulo 10.2 de las instrucciones de uso y se analizaron por duplicado. En general se determinó la proporción mínima de alelos disponibles.

Los resultados de las pruebas comparativas se resumen en el intervalo Imagen 2 a la Imagen 4 hasta el final del ejercicio.

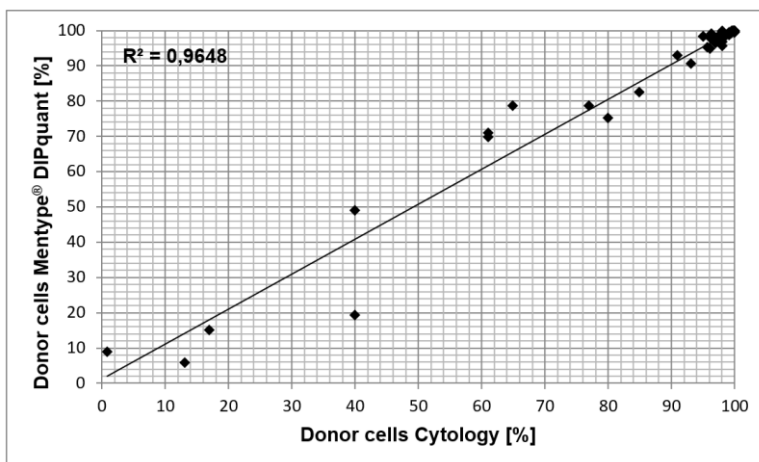


Imagen 2 Comparativa de los ensayos Mentype® **DIPquant** con citología en el análisis de quimerismo

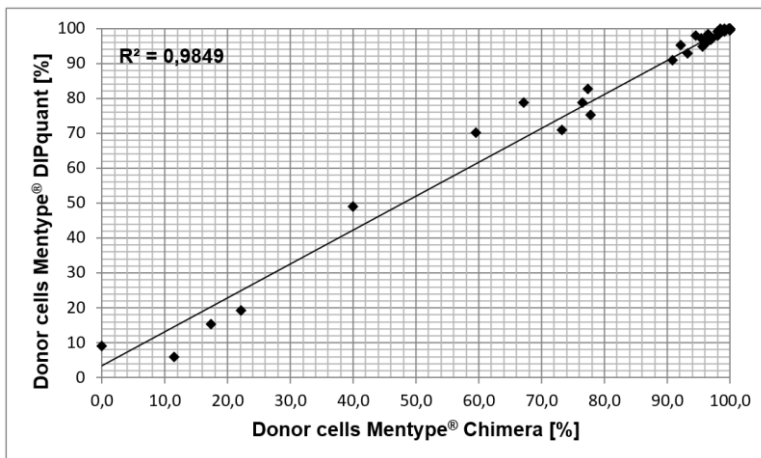


Imagen 3 Comparativa de los ensayos Mentype® DIPquant y Mentype® Chimera® en el análisis de quimerismo

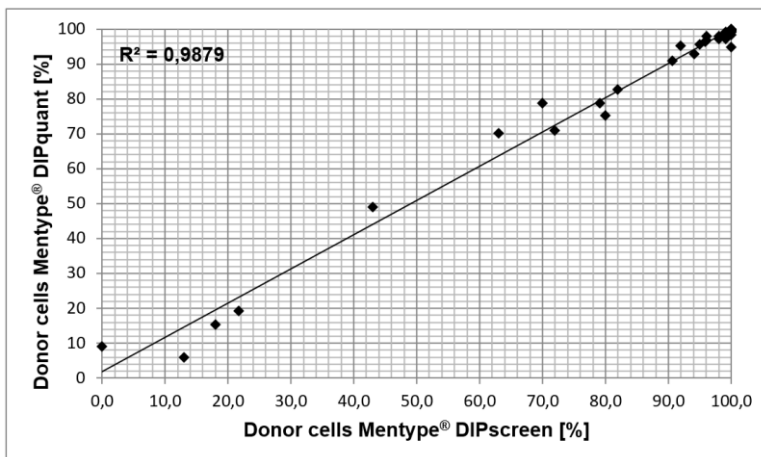


Imagen 4 Comparativa de los ensayos Mentype® DIPquant con Mentype® DIPscreen en el análisis de quimerismo

El coeficiente de comparación (R^2) de Mentype® **DIPquant** en comparación con FISH, Mentype® **Chimera**® y Mentype® **DIPscreen** fue de 0,9648, 0,9849 y 0,9879. La mejor coincidencia se alcanzó con Mentype® **DIPscreen**, que posee el mismo biomarcador: La menor coincidencia del FISH refleja las diferencias técnicas. De acuerdo con las instrucciones del fabricante deben contabilizarse al menos 200 células. Se logran mejores resultados con un recuento de más de 500 células (Buño *et al.* 2005): Esto no se consiguió en todas las muestras.

La validez científica de todos los marcadores biológicos analizados para el análisis de quimerismo ha sido a menudo recogida en la literatura (Thiede *et al.* 2001; Thiede y Lion 2001; Wilhelm *et al.* 2002; Buño *et al.* 2005). Las pruebas basadas en PCR ya se aceptan en las directrices clínicas (Bader *et al.* 2016). A continuación se utilizó el FISH como análisis comparativo. Esta técnica sigue teniendo un valor local en el caso de trasplantes que no coinciden en el sexo. Sin embargo, solo muestra una sensibilidad del 1 % para la población celular más pequeña. La PCR múltiple, basada en repeticiones en tándem cortas (STR), como Mentype® **Chimera**®, es denominada a menudo como estándar de oro del análisis de quimerismo (Bader *et al.* 2016). Los marcadores bialélicos, como los DIPs, ofrecen ventajas técnicas, como, por ejemplo, ningún pico stutter en la electroforesis capilar en gel o su idoneidad para la qPCR, que pueden alcanzar sensibilidades inferiores al 0,1 % (Wilhelm *et al.* 2002; Bader *et al.* 2016).

B e) Referencias

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

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

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

Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, Mohr B, Florek M, Kroschinsky F, Geissler G, Naumann R, Ritter M, Prange-Krex G, Lion T, Neubauer A, Ehninger G. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (B SCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia*. 2001 Feb;15(2):293-302. PubMed PMID: 11236950.

Thiede C, Lion T. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Leukemia*. 2001 Feb;15(2):303-306. PubMed PMID: 11418870.

Wilhelm J, Reuter H, Tews B, Pingoud A, Hahn M. Detection and quantification of insertion/deletion variations by allele-specific real-time PCR: application for genotyping and chimerism analysis. *Biol Chem*. 2002 Sep;383(9):1423-33. PubMed PMID: 12437135

Biotype GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 Dresden

Tel. +49 351 8838 400

Fax +49 351 8838 403

support@biotype.de

www.biotype.de