

Mentype[®] DIPscreen

Instrucciones de uso

El primer paso para la cuantificación de pruebas de quimerismo

Diagnóstico in vitro



DISIFU01v4es
Abril 2023

REF

45-45410-0025
45-45410-0100

LOT

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

Descripción del producto

Mentype® **DIPscreen** es una aplicación de PCR múltiple para la identificación de loci DIP informativos para la diferenciación donante/receptor tras un trasplante allogénico de células madre. Una reacción de cribado de esta aplicación registra el estado de alelos de un total de 33 loci DIP bialélicos, así como del marcador de amelogenina específico del sexo.

El análisis de quimerismo molecular es esencial para controlar el crecimiento del trasplante de células madre o para prevenir un riesgo de rechazo. El análisis de quimerismo molecular puede realizarse mediante distintas secuencias de ADN. En este caso, las llamadas inserciones/deleciones de polimorfismos (DIPs/INDELs) ofrecen una gran ventaja. En comparación con otras secuencias del ADN, la amplificación catalítica de la enzima de estos loci no da lugar a la formación de artefactos y polimorfismos de picos stutter, y los polimorfismos DIP son muy adecuados para el análisis cuantitativo mediante la tecnología de la qPCR. Un diagnóstico basado en las DIPs puede, por tanto, valorar correctamente la vigilancia clara y altamente cuantitativa del estado de quimerismo.

Los 33 loci DIP analizados se encuentran en una distancia de al menos 10 Mbp entre sí y están distribuidos en 18 cromosomas (tabla 1). El límite de detección de Mentype® **DIPscreen** es de **200 pg de ADN genómico**. El intervalo óptimo para el análisis en condiciones estándar se sitúa entre 1,0 y 2,0 ng de ADN. Los cebadores están marcados con los colorantes fluorescentes **6-FAM, BTG y BTY**.

La validación y evaluación del ensayo se ha llevado a cabo en los equipos GeneAmp® 9700 Silber (modo máximo), Eppendorf Mastercycler ep-S, Biometra T1, ProFlex PCR System, analizador genético ABI PRISM® 3130, Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer utilizando capilares de 36 cm y polímero POP4®.

Índice de contenido

1. Descripción de Mentype® DIPscreen	5
2. Amplificación por PCR	9
2.1 Composición de la mezcla maestra	9
2.2 Parámetros de amplificación por PCR.....	10
3. Electroforesis capilar en gel.....	11
3.1 Preparación de los productos de PCR.....	11
3.2 Análisis de la longitud del fragmento	11
4. Evaluación.....	13
4.1 Archivos de plantillas BIOTYPE.....	14
4.2 Controles.....	15
4.3 Longitud de fragmentos y alelos.....	16
5. Interpretación de los resultados	20
6. Referencias	21
7. Explicación de los símbolos	22
A Validación analítica	23
A a) Determinación de la reacción estándar y de las tolerancias específicas del lote 23	
A b) Evaluación de la precisión del genotipado	23
A c) Evaluación de la especificidad analítica	24
A d) Evaluación de la sensibilidad analítica	24
A e) Evaluación de distintos termocicladores de PCR	24
A f) Evaluación de distintas muestras variadas de ADN	25
A g) Evaluación del efecto de distintas temperaturas de hibridación en la PCR	25
A h) Evaluación de distintos lotes de buffer para PCR	25
A i) Evaluación de la estabilidad a corto plazo	26
B Datos del rendimiento clínico	26
B a) Muestreo y aspectos éticos y normativos.....	26
B b) Pruebas comparativas	26
B c) Extracción de ADN y purificación	27
B d) Resultados.....	27
B e) Referencias	29

1. Descripción de Mentype® DIPscreen

Tabla 1. Información específica del locus para Mentype® DIPscreen

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

Abreviaturas: HLD = Human Locus DIP, -DIP = Delecion o delección, +DIP = Insercion o inserción

La tabla 1 muestra la posición cromosómica, la secuencia y el alelo de referencia correspondiente con los loci DIP detectados con Mentype® DIPscreen.

Contenido

Mentype® DIPscreen

Etiqueta	Contenido	Volumen	
		25 Reacciones	100 Reacciones
Nuclease-Free Water	Agua libre de nucleasas	1,5 mL	2 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Mezcla de reacción A	125 µL	500 µL
Mentype® DIPscreen PrimerMix	Mezcla de cebador	125 µL	500 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL) o Polymerase N*	ADN polimerasa Multi Taq 2 o polimerasa N*	15 µL	60 µL
Mentype® DIPscreen Control DNA XY82 (2 ng/µL)	ADN de control XY82 (2 ng/µL)	10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Patrón de tamaño molecular 550 (BTO)	13 µL	50 µL
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder	Escalera alélica	25 µL	25 µL

* A partir del número de lote LEUK01107 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

Tabla 2. Información del pedido del kit Mentype® DIPscreen

Nombre del producto	Tamaño del envase	Número de pedido
Mentype® DIPscreen	25 Reacciones	45-45410-0025
Mentype® DIPscreen	100 Reacciones	45-45410-0100

Almacenamiento

Debe almacenarse 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 tamaño molecular) 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 Mentype® DIPscreen

Reactivo	Proveedor	Número de pedido
Hi-Di™ Formamide, 25 mL	Applied Biosystems	4311320
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.

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.

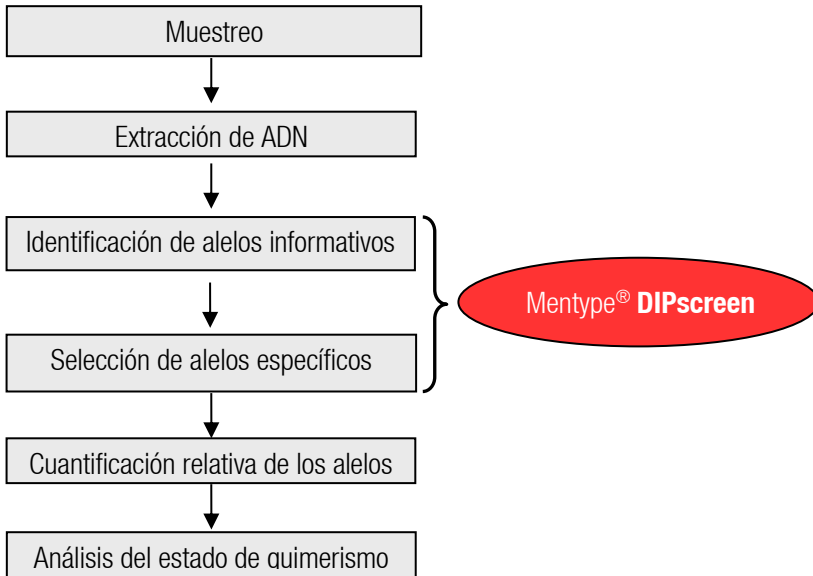
Marcas y patentes

Mentype® es una marca registrada de BIOTYPE GmbH.

ABI PRISM®, 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).

Descripción del análisis de quimerismo con el producto Mentype® DIP

Desde el muestreo hasta el análisis - el análisis de quimerismo con la aplicación Mentype® **DIPscreen**

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 de PCR para Mentype® DIPscreen

Componentes	Volumen
Nuclease-Free Water	13,4 µL
Reaction Mix A*	5,0 µL
Mentype® DIPscreen PrimerMix	5,0 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL) o Polymerase N	0,6 µL
Volumen total de la mezcla maestra	24,0 µL
Empleo de ADN patrón y de los controles	1,0 µL

* contiene Mg²⁺, dNTPs, BSA

Todos los reactivos deben mezclarse bien 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 con una concentración escasa de ADN, 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 **28 ciclos de PCR con 1 ng de ADN de control XY82** 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.

ADN patrón

La cantidad óptima de ADN es de **1-2 ng por reacción**. 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.

Control positivo

Para el control positivo, diluya el ADN de control XY82 a 1 ng/μL en el volumen correspondiente. Pipetee el ADN de control diluido en lugar del ADN patrón en el recipiente de reacción con la mezcla maestra para la PCR.

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.

2.2 Parámetros de amplificación por PCR

Para activar la ADN polimerasa 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 recomiendan 28 ciclos de PCR.

Método estándar

Recomendado para todas las muestras de ADN

Tabla 5. Protocolo estándar de amplificación para la ejecución de Mentype® DIPscreen

Temperatura	Tiempo	
94 °C	4 min (arranque en caliente para la activación de la ADN polimerasa)	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	28 ciclos
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	hasta el final

Observación: Para un equilibrio óptimo del kit recomendamos ajustar las rampas de calentamiento y enfriamiento de los equipos de PCR en aprox. 4-5 °C/s.

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 ciclador 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 6 de formamida Hi-Di™ y el patrón de longitud BTO (550), y añada a la composición una o dos reacciones para compensar las variaciones producidas por el pipeteo.

Tabla 6. 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 de Mentype® **DIPscreen** por pocillo. Tape la placa de PCR con una película adecuada, mézclela en el vórtex y centrifugue la placa brevemente. Retire la película 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 longitud del fragmento, 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 ciclador 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 longitud del fragmento.

3.2 Análisis de la longitud del fragmento

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 multi (BIOTYPE GmbH), cree un módulo de funcionamiento específico (ABI 3130) o un protocolo de instrumentos (ABI 3500) con los siguientes parámetros:

Tabla 7. Parámetros de funcionamiento específicos para el análisis de la longitud del fragmento de Mentype® **DIPscreen**

	ABI 3130	ABI 3500
Injections Voltage [kV]	3.0	3.0
Run Time	1500 s	1500 s
Injection Time [s]	10	10

No obstante lo dispuesto en los valores de la tabla 7, el tiempo de funcionamiento puede ajustarse para analizar todos los fragmentos (60-550 bp) del patrón de longitud 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.

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 cuando Mentype® **DIPscreen** realiza la evaluación.

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 longitud de ADN. Para garantizar un análisis seguro, debe utilizarse el número máximo de puntos de referencia equidistantes para la determinación de la longitud. Para ello, utilice el patrón de longitud 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.

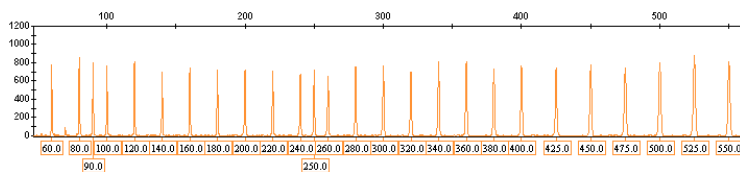


Imagen 1 Electroferograma del patrón de longitud de ADN 550 (BTO), longitud del fragmento en bp

Observación: Para la evaluación y el análisis de Mentype® **DIPscreen** con el software *ID/ID-X* de *GeneMapper®* puede utilizarse el modelo de evaluación facilitado del patrón de longitud de ADN SST-BTO_60-450bp.

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 modelos de evaluación Mentype® **DIPscreen** de BIOTYPE.

Los archivos de plantillas BIOTYPE (Template Files) están disponibles en nuestra página web (www.biotype.de).

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

Panels	DIPscreen_Panels_v1/v1X	o una versión superior
BinSets	DIPscreen_Bins_v1/v1X	o una versión superior
Size Standard	SST-BT0_60-450bp	
Analysis Method	Analysis_DIPscreen_3130_1000rfu Analysis_DIPscreen_3130_200rfu	
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 alleles	

Los paneles y conjuntos de bins deben ser utilizados siempre, el resto de archivos de plantillas son opcionales. Los archivos recomendados de BIOTYPE para el software ID/ID-X de GeneMapper® han sido generados para utilizar POP4®. Si se utiliza otro tipo de polímero, antes de analizar los datos se deberá llevar a cabo modificaciones en los paneles y conjuntos de bins así como en el método de análisis. En nuestra página web (www.biotype.de) podrá descargar una guía detallada en BIOTYPE Template Files para GeneMapper®.

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).

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 XY82 incluido en Mentype® **DIPscreen** así como los ADN's disponibles en el mercado representan los siguientes alelos:

Tabla 8. Determinación de alelos de Mentype® **DIPscreen**, -DIP = Delecion o deleción, +DIP = Insercion o inserción

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

El ADN de referencia K-562 está disponible en ATCC. El ADN 9947A, 9948 y 3657 puede obtenerse en el Depósito de Células Coriell

4.3 Longitud de fragmentos y alelos

Los valores especificados en la tabla 9 para longitudes de fragmento de alelos individuales se refieren al patrón de longitud de ADN 550 (BTO) y la medición en el analizador genético ABI PRISM® 3130 con polímero POP4®. Pueden producirse variaciones al utilizar otros equipos de análisis, otros patrones de longitud de ADN 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 la longitud de fragmentos.

Además, se debe llevar a cabo una comparación visual con la escalera alélica.

Escalado

Horizontal: 70-430 bp (véase imagen 2 y 3)

Vertical: según la intensidad de la señal de las muestras

Imagen 2

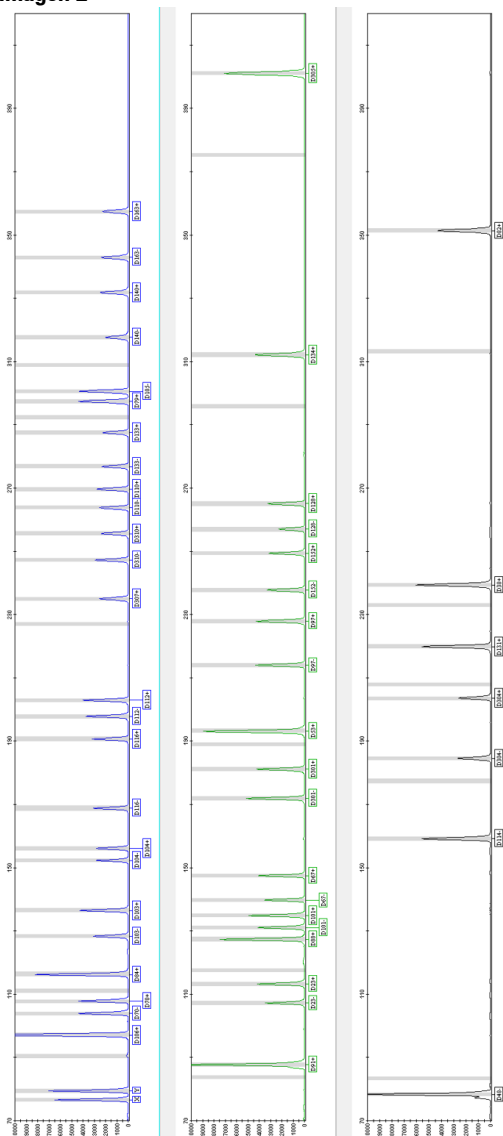


Imagen 2 Electroferograma de Mentype® **DIPscreen** utilizando 1 ng de ADN de control XY82. El análisis se realizó en el analizador genético ABI PRISM® 3130 con POP4®. Como patrón de tamaño molecular se ha utilizado BTO 550. La clasificación de alelos ha sido realizada con el software ID-X de GeneMapper® y el archivo de plantillas **DIPscreen**.

Imagen 3

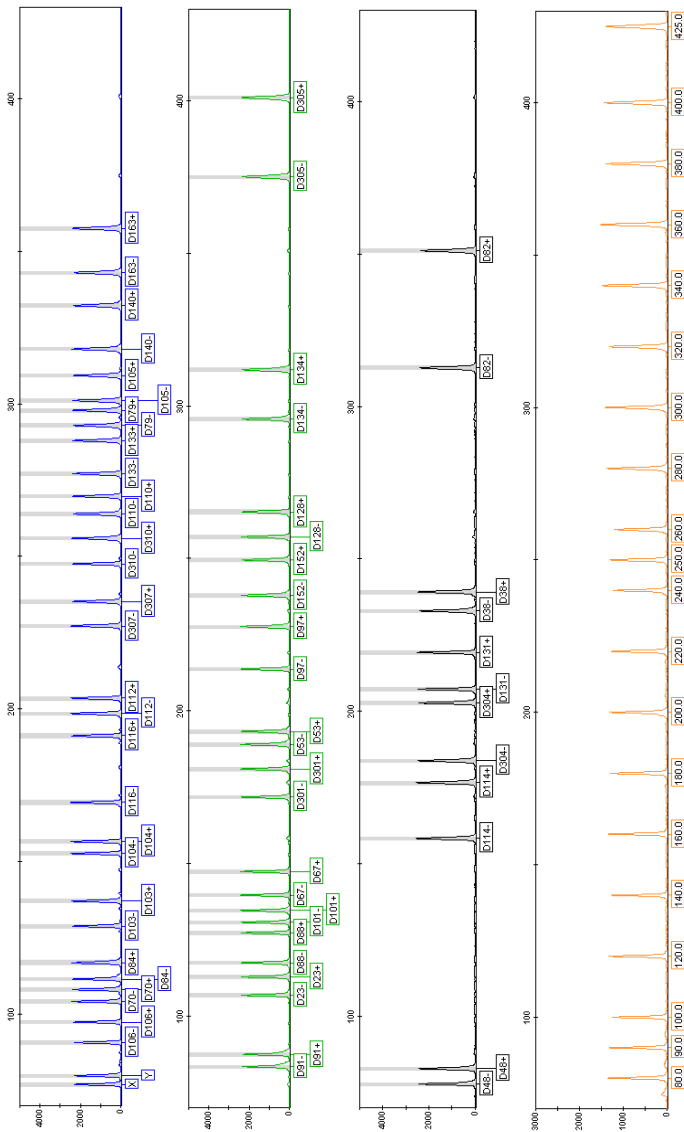


Imagen 3 Electroferograma de la escalera alélica Mentype[®] **DIPscreen** analizado en el analizador genético ABI PRISM[®] 3130 con POP4[®] y el patrón de longitud de ADN 550 (BTO). La clasificación de alelos ha sido realizada con el software ID-X de GeneMapper[®] y el archivo de plantillas **DIPscreen** .

Tabla 9. Longitudes de fragmentos de la escalera alélica Mentype® **DIPscreen** medidas en Analizador genético ABI PRISM® 3130 con polímero POP4® (panel FAM, BTG, BTY)

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

* redondeado a números enteros

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.

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).

Acumulación de nucleótidos independiente del patrón

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® **DIPscreen** ha sido validado y certificado en POP4®. El uso de otro polímero (p. ej. POP7™ o POP6™) 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. 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.

Chen DP, Tseng CP, Wang WT, Wang MC, Tsai SH, Sun CF (2011) Real-time biallelic polymorphism-polymerase chain reaction for chimerism monitoring of hematopoietic stem cell transplantation relapsed patients. *Clin Chim. Acta* 412, 625-630.

Harries LW, Wickham CL, Evans JC, Rule SA, Joyner MV, Ellard S (2005) Analysis of haematopoietic chimaerism by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bone Marrow Transplant.* 35, 283-290.

Masmas TN, Madsen HO, Petersen SL, Ryder LP, Svejgaard A, Alizadeh M, Vindelov LL (2005) Evaluation and automation of hematopoietic chimerism analysis based on real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biol Blood Marrow Transplant.* 11, 558-566.

Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, Devine SE (2006) An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome Res* 16 (9):1182-1190, 2006.

Qin XY, Li GX, Qin YZ, Wang Y, Wang FR, Liu DH, Xu LP, Chen H, Han W, Wang JZ, Zhang XH, Li JL, Li LD, Liu KY, Huang XJ (2011) Quantitative assessment of hematopoietic chimerism by quantitative real-time polymerase chain reaction of sequence polymorphism systems after hematopoietic stem cell transplantation. *Chin Med J (Engl.)* 124, 2301-2308.

Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G (2002) Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet* 71(4):854-862.

Wilhelm J, Reuter H, Tews B, Pingoud A, Hahn M (2002) Detection and quantification of insertion/deletion variations by allele-specific real-time PCR: application for genotyping and chimerism analysis. *Biol Chem* 383, 1423-1433.

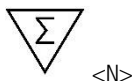
7. Explicación de los símbolos



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 de amplificación por PCR de Mentype® DIPscreen

A Validación analítica

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

Objetivo: Se determina la reacción estándar y 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 del ADN de control XY13 de un donante sano, el cual es heterocigótico para amelogenina en 17 sistemas DIP. La reacción estándar (28 ciclos de PCR) se ha realizado con el ADN de control en la concentración nominal de 1 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® 3130 se han alcanzado niveles de señal de 1 000-5 000 RFU. Las variaciones para niveles de señal de sistemas heterocigóticos no superaron el 50 % del valor de referencia. En el intervalo de escalado no se han detectado señales inespecíficas de 200 RFU (línea base) para los valores blancos.

A b) Evaluación de la precisión del genotipado

Objetivo: En condiciones estándar debería garantizarse estadísticamente la precisión de la clasificación de alelos. La evaluación ha comprobado 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. Además, mediante los resultados se han establecido los ajustes del equipo específicos del ensayo para el genotipado a través de electroforesis capilar en gel (bins y paneles) para los ficheros de plantillas de los equipos de secuenciación de ADN.

Metodología: Se han analizado en una sola determinación 100 ADNs identificados previamente de donantes 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 > 200 RFU (evaluación manual) [1; 2].

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 HLD y el marcador amelogenina.

A c) Evaluación de la especificidad analítica

Objetivo: Los estudios han servido 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 las zonas de alelos (< 200 RFU).

A d) Evaluación de la sensibilidad analítica

Objetivo: Los ensayos se han utilizado para determinar el límite de detección analítica (sensibilidad).

Metodología: Se sometió a ensayo una serie de diluciones de 1 pg hasta 65 pg de ADN de referencia en determinación cuádruple. Los perfiles completos de ADN con > 100 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 la reacción estándar con ADN de control en la concentración nominal de 1 ng se ha realizado con los termocicladores descritos en el capítulo 1.1 en determinaciones cuádruples con la misma mezcla maestra. Además se analizaron dos blancos sin ADN.

Resultados: No se han detectado subproductos no específicos de > 200 RFU en la zona de alelos.

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 alogénicas es la demostración independiente 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 poder mostrarse la menor cantidad posible del ADN del receptor. Por ello, en la validación analítica se crearon distintas mezclas de dos ADNs definidos con distintos genotipos.

Metodología: Se han producido 10 mezclas independientes a partir de dos ADNs no emparentados, donde la proporción menor de ADN era de 0 %, 1 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 % y 70 %. Entre dos ADNs en las mezclas se pudieron insertar una media de 13 loci DIP ($12,8 \pm 2,22$) con alelos informativos para la evaluación. Cada 2 ng de la mezcla de ADN se ha probado en la reacción estándar (véase capítulo C). Se han analizado niveles de señal de al menos 50 RFU.

Resultados: 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 [3-6].

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

Objetivo: Para determinar la solidez de las PCR, se han simulado 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 1 ng ha variado ± 1 °C y ± 2 °C. Se ha realizado una determinación triple con la misma mezcla maestra.

Resultados: Para ± 1 °C no se han detectado subproductos no específicos de > 200 RFU en la zona de alelos. Las alturas del pico promediadas varían en ± 1 °C, máximo ± 30 % de la reacción estándar. Para $+ 2$ °C se han detectado señales descendentes en algunos sistemas (HLD 84, 103, 116, 112, 133, 105,140, 67, 48), un sistema (HLD 91) cayó por completo.

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 debería probar en función de las variaciones de lotes de la solución buffer facilitada para la PCR.

Metodología: Se han analizado 4 lotes independientes de mezcla de reacción A en la reacción estándar con ADN de control de la concentración nominal de 1 ng.

Resultados: No se han detectado subproductos no específicos de > 200 RFU en la zona de alelos. La desviación de las alturas de pico medias en comparación con la reacción estándar no ha superado el 20 %.

A i) Evaluación de la estabilidad a corto plazo

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 1 ng 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, se encontraron picos adicionales > 200 RFU dentro de la escala y fuera del intervalo de alelos (colorante libre en el panel BTG).

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 el kit de amplificación CE-IVD Mentype® **Chimera**® (BIOTYPE GmbH, Dresden), el cual está basado en repeticiones cortas en tándem (STRs) [12]. Además, se realizó la separación citogenética de los leucocitos de donantes y de receptores mediante la hibridación in situ fluorescente (FISH) [11]. Para ello, 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

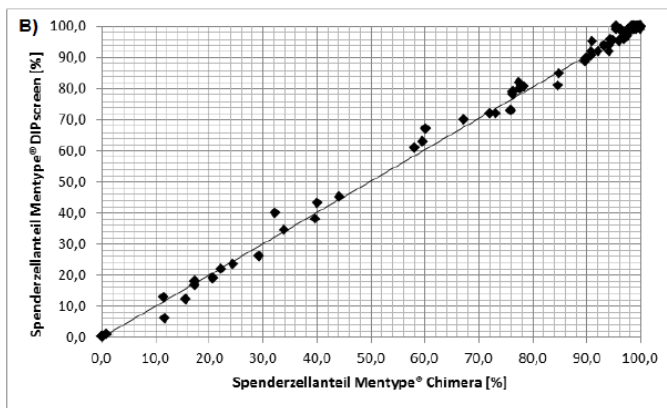
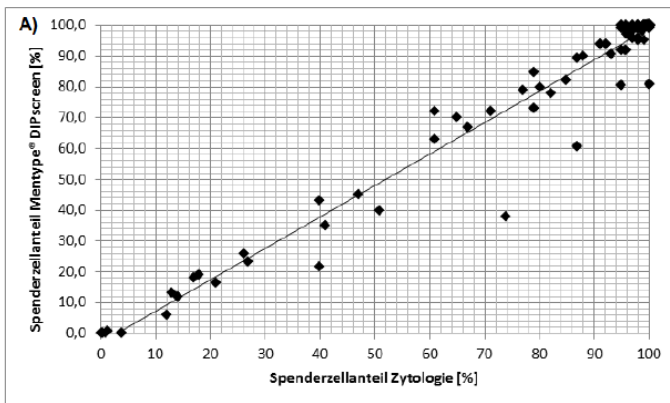
La extracción de ADN de sangre completa heparinizada se realizó con el kit *QIAamp® DNA Blood Mini* (Qiagen GmbH, Hilden, DE) según las indicaciones del fabricante.

B d) Resultados

Se recogieron en total 98 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, fueron adecuadas para el FISH específico de cromosomas sexuales [5]. 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 o DIP de las parejas receptor-donante y se confirmó el género mediante el genotipado del marcador amelogenina, el cual es parte integrante de las PCR múltiples. Para la evaluación de la PCR se han utilizado los valores promedio de los niveles de señal de todos los sistemas STR o DIP informativos [3]. Los resultados de las pruebas comparativas se resumen en la imagen 1.

En comparación con la citogenética, utilizando Mentype® **DIPscreen** se hallaron 11 muestras que se desviaban de la cuota de la proporción de células de donante de más del 5 % (absoluto) (véase figura 10A). En la citogenética de 5 de estas muestras se contabilizó una cantidad significativamente menor de 200 células. 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 [6, 8]. En contraste con la citogenética, las desviaciones de Mentype® **DIPscreen** con respecto al kit de PCR múltiple Mentype® **Chimera®** basado en STRs alcanzaron un máximo del 7,9 % (véase imagen 4B). Solo 3 de los 98 conjuntos de datos de medición mostraron una desviación de más del 5 %.

Imagen 4: Análisis de concordancia de la PCR múltiple Mentype® **DIPscreen** en comparación con la citología (A) y la PCR múltiple Mentype® **Chimera**® (B)



B e) Referencias

- 1) **Gilder JR, Doom TE, Inman K, Krane DE.** Run-specific limits of detection and quantitation for STR-based DNA testing. *J Forensic Sci* 2007; 52: 97-101.
- 2) **Schneider PM, Fimmers R, Keil W, Molsberger G, Patzelt D, Pflug W, Rothämel T, Schmitter H, Schneider H, Brinkmann B.** The German Stain Commission: recommendations for the interpretation of mixed stains. *Int J Legal Med.* 2009; 123: 1-5.
- 3) **Thiede C, Lion T.** Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. Appendix: Method in focus. *Leukemia* 2001; 15: 303–6.
- 4) **Thiede C.** Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. *Am J Pharmacogenomics* 2004; 4: 177-87.
- 5) **Thiede C, Lion T.** Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. Appendix: Method in focus. *Leukemia* 2001; 15: 303–6.
- 6) **Buño I, Nava P, Simón A, González-Rivera M, Jiménez JL, Balsalobre P, Serrano D, Carrión R, Gómez-Pineda A, Díez-Martín JL.** A comparison of fluorescent in situ hybridization and multiplex short tandem repeat polymerase chain reaction for quantifying chimerism after stem cell transplantation. *Haematologica* 2005; 90: 1373-9.
- 7) **Henke L, Muche M, Blaauw A, Van Eede PH, Martin W, Helmken C, Budowle B, Henke J.** Validation of a "new" short tandem repeat (STR) fluorescent multiplex system and report of population genetic data. *Clin Lab* 2007; 53:477-82.
- 8) **Mohr B, Koch R, Thiede C, Kroschinsky F, Ehninger G, Bornhäuser M.** CD34+ cell dose, conditioning regimen and prior chemotherapy: factors with significant impact on the early kinetics of donor chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 949-54.

BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN / GERMANY
Tel. +49 351 8838 400
Fax +49 351 8838 403
support@biotype.de
www.biotype.de