

Mentype[®] Chimera[®]

Instruções de Utilização

Um novo padrão na análise de quimerismo.

Para fins de diagnóstico in vitro



CHNIFU01v2pt
Novembro de 2020



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



Número do lote



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
D-01109 Dresden
Alemanha

Fabricado na Alemanha

A Biotype GmbH desenvolve, produz e comercializa os seus próprios kits de deteção rápida baseada na tecnologia PCR, sob a denominação comercial Mentype®. Os nossos produtos proporcionam métodos de teste rápidos e fiáveis aos nossos clientes, para fins de diagnóstico médico profissional.

Os nossos kits Mentype® garantem os mais elevados padrões de qualidade nas áreas da investigação clínica e diagnóstico.

Para obter mais informações e fazer consultas sobre o kit de amplificação por PCR Mentype® **Chimera**®, não hesite em contactar-nos ou visite nos em www.biotype.de

Mentype® Chimera®

Descrição do produto

O Mentype® **Chimera**® é uma aplicação de PCR multiplex desenvolvida especificamente para fins de monitorização do quimerismo na sequência de transplante de células estaminais hematopoiéticas e medula óssea, respetivamente. O ensaio foi validado através da análise de quimerismo em mais de 200 pares de doadores-recetores compatíveis no âmbito do sistema HLA, e a sua adequação foi avaliada e comprovada por meio de um estudo de avaliação clínica comparativa. Desde então, o ensaio tem vindo a ser utilizado com sucesso em diagnósticos clínicos de rotina.

Os marcadores genéticos avaliados pelo kit Mentype® **Chimera**® encontram-se distribuídos por 12 cromossomas e representam microssatélites altamente polimórficos (STR, do inglês "Short Tandem Repeats") com taxa de heterozigose bastante elevada e distribuição equilibrada dos alelos. Em conjunto, estas características aumentam significativamente a possibilidade de identificar loci informativos que a permitam efetuar a discriminação entre doador e recetor, proporcionando assim segurança e robustez à análise de quimerismo.

Numa única reação de PCR são amplificados simultaneamente os loci autossómicos **D2S1360, D3S1744, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517, D8S1132, D10S2325, D12S391, D18S51, D21S2055, SE33 (ACTBP2)**, e o locus específico de género **amelogenina**. Por cada locus, é identificado um primer, através de um marcador fluorescente **6-FAM, BTG** ou **BTY**.

O limite de deteção do kit de amplificação por PCR Mentype® **Chimera**® é de **200 pg de ADN genómico**. O intervalo ideal, em condições padrão, é de **0,2-1,0 ng de ADN**.

O kit foi validado através da utilização dos equipamentos GeneAmp® PCR System 9700 Aluminium, Eppendorf Mastercycler ep-S, Biometra T1, ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer e ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer com polímero POP-4®.

Índice

1. Descrição do Mentype® Chimera®	5
2. Amplificação por PCR	9
2.1 Preparação da mistura principal	9
2.2 Parâmetros da amplificação por PCR.....	10
3. Eletroforese capilar em gel	12
3.1 Preparação dos produtos de PCR.....	12
3.2 Análise de extensão dos fragmentos	12
4. Análise	14
4.1 Ficheiros modelo para a análise (Biotype template files).....	14
4.2 Controlos.....	16
4.3 Extensão dos fragmentos e alelos	16
5. Interpretação dos resultados	23
6. Dados genéticos populacionais	24
7. Referências	27
8. Explicação dos Símbolos	28
A Validação analítica	29
A a) Determinação do padrão de reação e tolerância específica do lote	29
A b) Precisão da genotipagem	29
A c) Especificidade analítica	30
A d) Sensibilidade analítica	30
A e) Diferenças de comportamento nos ensaios realizados com termocicladores distintos	30
A f) Amostras de ADN misturado	31
A g) Temperaturas de recozimento de PCR.....	31
A h) Flutuação dos lotes de tampões de PCR	32
A i) Inibidores de PCR.....	32
A j) Estabilidade durante a utilização	32
B Dados de desempenho clínico	33
B a) Desenho do estudo, aspectos éticos e regulamentares	33
B b) Métodos de referência.....	33
B c) Extração e purificação de ADN	33
B d) Resultados.....	33
B e) Referências	34

1. Descrição do Mentype® Chimera®

Tabela 1. Informações específicas dos locus para o kit Mentype® Chimera®

Locus	Entrada no GenBank	Motivos de repetição do alelo de referência	Alelo de Referência	Intervalo do Alelo
Amelogenina X	M55418			
Amelogenina Y	M55419			
D2S1360	G08130	[TATC] ₉ [TGTC] ₂ [TATC] ₅	23	19-32
D3S1744	G08246	[TCTA] ₂ TA[TCTA] ₁₂ TCA [TCTA] ₂	16	13-22
D4S2366	G08339	[ATAG] ₉ ATTG [ATAG] ₂	12	9-15
D5S2500	G08468	[ATAG] ₁₂	12	9-18
D6S474	G08540	[TAGA] ₅ TGA [TAGA] ₁₂	17	11-20
D7S1517	G18365	[GAAA] ₁₁ CAAA [GAAA] ₂ CAAA [GAAA] ₂	17	14-31
D8S1132	G08685	[TCTA] ₉ TCA [TCTA] ₉ TCTGTCTA	20	12.1-27
D10S2325	G08790	[TCTTA] ₁₂	12	6-23
D12S391	G08921	[AGAT] ₅ GAT [AGAT] ₇ [AGAC] ₆ AGAT	19.3	13-28
D18S51	L18333	[AGAA] ₁₃	13	5.3-42
D21S2055	G27274	[CTAT] ₂ CTA [CTAT] ₉ CTA [CTAT] ₃ TAT [CTAT] ₃ TAT [CTAT] ₄ CAT[CTAT] ₂	24	16.1-39
SE33 (ACTBP2)	NG000840	[AAAG] ₉ AA [AAAG] ₁₆	25.2	3-50

A Tabela 1 mostra os loci STR e respetivos motivos de repetição e alelos, em conformidade com as diretrizes estabelecidas pela “International Society for Forensic Genetics” (ISFG; Bär *et al.*, 1997), para a utilização de marcadores microssatélites. No caso dos loci STR D8S1132 e D12S391, aplica-se a nomenclatura de Hering e Müller (2001); no que se refere a os loci D4S2366 e D6S474, é utilizada a nomenclatura de Becker *et al.* (2007); para o locus D10S2325, a de Wiegand *et al.* (1999); e para o locus D7S1517, a nomenclatura adotada é a de Wiegand e Klintschar (2002). As gamas de alelos incluem todos os alelos conhecidos que constam dos registos do National Institute of Standards and Technology (NIST a partir de 12/2008) e de toda a literatura atual.

Tabela 2. Mapeamento cromossómico do sistema Mentype® Chimera®

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

Conteúdo do Kit

Kit de Amplificação por PCR Mentype® **Chimera**®

Componente	Reagente	Volume por tamanho do kit		
		25 reações	100 reações	400 reações
Nuclease-Free Water	Água isenta de nucleases	1,5 mL	2x 1,5 mL	6x 1,5 mL
Reaction Mix A	Mistura de reação A	125 µL	500 µL	2x 1,0 mL
Mentype® Chimera ® Primer Mix	Mistura de primers Mentype® Chimera ® Primer Mix	63 µL	250 µL	4x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Multi Taq 2 DNA Polymerase	10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® Chimera ® Control DNA XY5 ou Control DNA XY1726	Controlo de ADN Mentype® Chimera ® Control DNA XY5 (2 ng/µL) ou Control DNA XY1726 (2 ng/µL)	10 µL	10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Marcador de peso molecular DNA Size Standard 550 (BTO)	13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® Chimera ® Allelic Ladder	Escada alélica Mentype® Chimera ® Allelic Ladder	25 µL	25 µL	4x 25 µL

Tenha em atenção que não deve misturar componentes de kits fornecidos em lotes distintos. É possível consultar uma descrição geral dos números de lote na etiqueta que se encontra na parte interna da aba da caixa. Não é permitido fracionar os componentes do kit noutros recipientes ou tubos.

Informação referente à encomenda

Nota: A embalagem de 1000 reações deixou de poder ser encomendada.

Produto	Tamanho da Embalagem	Número de Referência
Mentype® Chimera ®	25 reações	45-13210-0025
Mentype® Chimera ®	100 reações	45-13210-0100
Mentype® Chimera ®	400 reações	45-13210-0400

Armazenamento

Armazenar todos os componentes a uma temperatura entre -25 °C e -15 °C, e evitar congelá-los e descongelá-los repetidamente. Os produtos Primer Mix (mistura de primers) e Allelic Ladder (escada alélica) deverão ser armazenados num espaço protegido da luz. O armazenamento das amostras de ADN e dos reagentes pós-PCR (Allelic Ladder e DNA Size Standard) deverá ser feito num espaço separado daquele onde se encontram os reagentes de PCR. A indicação da validade encontra-se inscrita na tampa da embalagem.

Reagentes adicionais necessários

Reagentes adicionais necessários para a utilização do kit de amplificação por PCR da Biotype®:

Tabela 3. Reagentes adicionais necessários para o kit Mentype® Chimera®

Reagente	Fornecedor	Referência
Hi-Di™ Formamide, 25 mL	Life Technologies Corporation	4311320
Matrix Standards BT5 single-capillary instruments (5 x 25 µL)	Biotype GmbH	00-10411-0025
Matrix Standards BT5 multi-capillary instruments (25 µL)	Biotype GmbH	00-10421-0025
Matrix Standards BT5 multi-capillary instruments (2 x 25 µL)	Biotype GmbH	00-10421-0050

Avisos e instruções de segurança

Leia as fichas de dados de segurança (FDS) de todos os produtos da Biotype®. Essas fichas poderão ser-lhe disponibilizadas a pedido. Para obter cópias das fichas de dados de segurança de quaisquer reagentes não se encontrem incluídos no kit, contacte o respetivo fabricante.

Até lote LEUK01073 (Reaction Mix A lote CH1901224)

O kit de amplificação por PCR contém substância seguinte produto químico potencialmente perigoso:

Componente do kit	Químico	Risco
Reaction Mix A	Azida de Sódio NaN_3	Tóxico por ingestão, produz gases tóxicos em contacto com ácidos

Garantia de qualidade

Todos os componentes do kit são submetidos a um processo intensivo de garantia e controlo de qualidade pela Biotype GmbH. A qualidade do kit de testes é permanentemente monitorizada, a fim de garantir que o mesmo se mantenha totalmente funcional. Se tiver alguma dúvida relativamente à garantia de qualidade, contacte-nos.

Marcas Registadas e Patentes

As denominações Mentype® e Chimera® são marcas registadas da Biotype GmbH. ABI PRISM®, GeneMapper®, GeneAmp® e Applied Biosystems® são marcas registadas da Applied Biosystems LLC.

Nos termos da legislação europeia, a denominação POP-4® é uma marca registada da Applied Biosystems LLC. Nos Estados Unidos, a denominação POP-4® é uma marca registada da Life Technologies Corporation.

A tecnologia PCR encontra-se protegida por patentes, cujos titulares são a Hoffmann-La Roche Inc. e F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Protocolos de amplificação por PCR, eletroforese e análise

2. Amplificação por PCR

2.1 Preparação da mistura principal

A tabela abaixo mostra os volumes necessários de todos os reagentes de PCR para um volume de reação de 25 μL , incluindo um volume de amostra de 1,0 μL (*ADN modelo*). O número de reações a definir deve ser estabelecido tendo em conta a inclusão de reações de controlo positivo e negativo. Adicione uma ou duas reações a esse número para compensar eventuais erros de pipetagem.

Tabela 4. Mistura principal de PCR para o kit Mentype® **Chimera**®

Componente	Volume
Nuclease-Free Water	16,1 μL
Reaction Mix A*	5,0 μL
Mentype® Chimera ® Primer Mix	2,5 μL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	0,4 μL
Volume da mistura principal	24,0 μL

* contém Mg^{2+} , dNTPs, BSA

Antes de se proceder à preparação da mistura principal, todos os componentes deverão ser misturados (vórtice) e centrifugados durante cerca de 10 segundos. O volume de ADN a utilizar no ensaio dependerá da respetiva concentração. Nas amostras de referência, a utilização de 1 μL será suficiente para a maioria das situações. Nas amostras críticas de pacientes, a quantidade de ADN poderá ser aumentada conforme necessário. Preencher com água isenta de nuclease, até obter um volume de reação final de 25 μL .

Regra geral, as amostras de ADN deverão ser armazenadas em água isenta de nuclease ou num tampão TE diluído (10 mM Tris HCl, pH 8,0 e 1 mM de EDTA), por exemplo, 0,1 x tampão TE buffer.

As misturas de primers (Primer Mix) encontram-se ajustadas de forma a permitirem obter alturas de picos equilibradas a 30 ciclos de PCR, com **0,5 ng de ADN Controlo XY5 resp. XY1726**, num volume de reação de PCR de 25 μL . Se for aplicada uma quantidade superior de ADN modelo, é expectável que surjam picos mais elevados nos segmentos de PCR mais pequenos, e picos relativamente baixos nos segmentos maiores. Para corrigir esse desequilíbrio, reduza a quantidade de ADN.

Controlo positivo

Nota: A partir do lote n.º **LEUK01071**, o kit inclui o novo controlo positivo de ADN **XY1726**. Este diverge do ADN XY5 de controlo anterior no seu perfil genético. A concentração e o procedimento experimental associado mantiveram-se inalterados. Com base no número de lote do kit e do conteúdo (no rótulo da caixa do kit), é possível determinar o ADN de controlo incluído no kit. O novo perfil genético, bem como os alelos a serem detetados, encontram-se na figura 2B e na tabela 9.

Para proceder à amplificação do controlo positivo, dilua o controlo de ADN XY5 resp. XY1726 a 0,5 ng/μL.

Pipete o ADN de controlo diluído, em vez do ADN modelo num tubo de reação com o volume adequado de mistura principal para PCR.

Controlo negativo

Para proceder à amplificação do controlo negativo, pipete água isenta de nuclease em vez do ADN modelo, num tubo de reação com o volume adequado de mistura principal para PCR.

AND modelo

Ocasionalmente, dependendo do método de quantificação de ADN que for empregue, é possível que o valor de concentração apurado apresente variações. Por conseguinte, poderá ser necessário ajustar a quantidade de ADN, a fim de garantir a obtenção de resultados ideais.

2.2 Parâmetros da amplificação por PCR

Para ativar a Multi Taq 2 DNA Polymerase e prevenir a formação de subprodutos de PCR não específicos, deverá ser efetuada uma PCR “hot start” (início a quente).

O número de ciclos da PCR depende da quantidade de ADN aplicada. Recomenda-se a utilização de 30 ciclos de PCR para todas as amostras. No caso das amostras de ADN críticas (< 100 ng ADN), o número de ciclos de PCR pode ser aumentado até 32.

Metodologia padrão

Recomendada para todas as amostras de ADN

Tabela 5. Protocolo padrão de amplificação por PCR para o kit Mentype® Chimera®

Temperatura	Tempo	
94 °C	4 min	(hot start para ativação da Multi Taq2 DNA Polymerase)
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	30 ciclos
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	<i>espera</i>

Opcional

Recomendado para pequenas quantidades de ADN

Tabela 6. Protocolo opcional de amplificação por PCR para pequenas quantidades de ADN

Temperatura	Tempo	
94 °C	4 min (hot start para ativação da Multi Taq 2 DNA Polymerase)	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	32 ciclos
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	<i>espera</i>

Nota: Se forem utilizados termocicladores com rampas rápidas de aquecimento e arrefecimento ($> 2 \text{ }^\circ\text{C/s}$), o valor da rampa deverá ser ajustado para $2 \text{ }^\circ\text{C/s}$, a fim de permitir que o kit apresente um equilíbrio ideal.

A utilização de quantidades de ADN muito baixas poderá resultar em falhas estatísticas e alturas de picos desequilibrados. O acréscimo do número de ciclos de PCR aumenta o risco de contaminação cruzada por quantidades mínimas de impurezas. Além disso, poderão surgir subprodutos de amplificação não específicos.

3. Eletroforese capilar em gel

3.1 Preparação dos produtos de PCR

Após a conclusão da PCR, retirar as amostras do termociclador e centrifugar por breves instantes. Descongelar os reagentes Hi-Di™ Formamide (não incluído no kit) e o marcador de peso molecular (DNA Size Standard 550 (BTO)), e misturar e centrifugar os tubos por breves instantes. Preparar a mistura de Hi-Di™ Formamide e DNA Size Standard 550 (BTO) de acordo com a Tabela 7, e adicionar uma ou duas reações extra para compensar quaisquer variações na pipetagem.

Tabela 7. Mistura de Hi-Di™ Formamide e DNA Size Standard 550 (BTO) para fins de desnaturação

Componente	Volume por reação
Hi-Di™ Formamide	12,0 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µL

Pipetar 12 µL da mistura desnaturante de formamida e BTO no número de poços adequado de uma placa de PCR (compatível com o Sequenciador Genético). Em seguida, adicionar a cada poço 1 µL do produto para PCR ou 1 µL de Mentype® **Chimera**® Allelic Ladder. Vedar a placa de PCR com uma película própria para o efeito e agita-la e centrifugá-la por breves instantes.

Nota: A Allelic Ladder (escada alélica) é utilizada durante a análise de resultados para determinar corretamente os fragmentos analisados. Em cada operação de análise de fragmentos deverá ser incluída e analisada uma escada alélica, a fim de garantir que a análise de resultados seja feita de forma correta.

Nota: Os capilares utilizados na eletroforese em gel nunca devem ficar secos. Se as amostras não ocuparem todas as posições dos capilares, preencha os poços remanescentes da placa com 12 µL de Hi-Di™ Formamide, de acordo com o número de capilares.

Desnature os produtos da PCR já preparados num termociclador, durante 3 minutos, a 95 °C. Em seguida, arrefeça as amostras no termociclador, até chegarem a 4 °C. Antes de realizar a análise de extensão dos fragmentos, centrifugue as amostras por breves instantes.

3.2 Análise de extensão dos fragmentos

Após a execução bem-sucedida da calibragem espectral do dispositivo de eletroforese capilar em gel com o reagente Matrix Standard BT5 (Biotype GmbH), crie um módulo de execução específico (ABI 310, ABI 3130) ou um protocolo de instrumento (ABI 3500) com os seguintes parâmetros:

Tabela 8. Parâmetros específicos de resp. para o módulo de execução/protocolo de instrumento do dispositivo de eletroforese capilar em gel

	ABI 310	ABI 3130	ABI 3500
Tensão Elétrica das Injeções [kV]	15,0	3,0	3,0
Tempo de Execução	28 min	1560 s	1560 s
Tempo de Injeção [s]	5	10	10

Se o tempo de execução diferir dos valores apresentados na Tabela 8, poderá ser ajustado, de forma a permitir analisar todos os fragmentos (60-550 bp) do marcador de peso molecular DNA Size Standard 550 (BTO).

Nota: Para programar os parâmetros de execução específicos, siga as instruções do fabricante do dispositivo de eletroforese capilar.

Nota: Consulte também os folhetos disponíveis de informações adicionais sobre calibragem e aplicação dos produtos Mentype® em instrumentos de eletroforese capilar. Esses folhetos são fornecidos pela Biotype GmbH mediante solicitação, que poderá enviar para support@biotype.de.

4. Análise

Para obter instruções gerais referentes à análise automática de amostras, consulte o Manual de Utilizador do software *GeneMapper® ID* ou *GeneMapper® ID-X*.

Nota: O painel vermelho do Mentype® **Chimera®** deverá estar desvanecido.

A determinação exata da extensão dos produtos amplificados depende do tipo de instrumento, condições da eletroforese, e marcador de peso molecular utilizado. Devido à complexidade de alguns loci STR, a determinação do tamanho dos fragmentos deve ser feita com base em pontos de referência, distribuídos de modo uniforme. Nesse sentido, dever-se-á proceder à utilização do marcador de peso molecular DNA Size Standard 550 BTO ao analisar os seguintes 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, e 550 bp**.

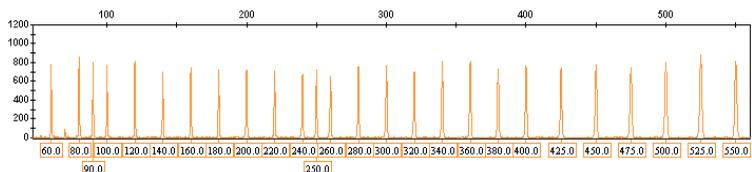


Fig. 1 Eletofereograma do DNA Size Standard 550 (BTO), tamanho dos fragmentos representado em bp

Nota: O ficheiro modelo disponibilizado para o marcador de peso molecular SST-BTO_60-500bp pode ser utilizado para analisar os resultados com o software *GeneMapper® ID* ou *ID-X*.

4.1 Ficheiros modelo para a análise (Biotype template files)

A atribuição de alelos deve ser feita através de um software de análise adequado, como o *GeneMapper® ID/ID-X* ou o *Genotyper*, em combinação com os ficheiros modelo Mentype® **Chimera®** da Biotype GmbH. Os ficheiros modelo encontram-se disponíveis para descarregamento na nossa página inicial (www.biotype.de) ou, a pedido, em CD-ROM.

Os ficheiros modelo da Biotype® recomendados para o Software *GeneMapper® ID/ID-X* são os seguintes:

Painéis (Panel)	Chimera_Panels_v1/v1X* ou versões superiores
BinSets	Chimera_Bins_v1/v1X* ou versões superiores
Tamanho Padrão (Size Standard)	SST-BTO_60-500bp
Método de Análise (Analysis Method)	Analysis_HID_310
	Analysis_HID_3130
	Analysis_HID_310_50rfu
	Analysis_HID_3130_50rfu

Definições Gráficas (Plot Settings)	PlotsBT5_4dyes
Definições de Tabela (Table Settings)	Table for 2 Alleles
	Table for 10 Alleles

#Devido ao novo controlo positivo, a partir do lote n.º **LEUK01071**, deve ser utilizado o conjunto de Painéis e Caixas **v2** para a avaliação dos dados.

A utilização dos Painéis e BinSets é sempre obrigatória, enquanto os restantes ficheiros modelo poderão ser utilizados facultativamente.

Ficheiros modelo adicionais da Biotype® para o software GeneMapper® ID-X:

Stutter* Chimera_Stutter_v1X* ou versão superior

* Ao carregar os painéis acima referidos, as configurações dos picos stutter não serão aceites, pelo que o ficheiro de picos "stutter" terá de ser importado separadamente.

Ficheiros modelo da Biotype® para o software Genotyper:

Mentype_Chimera_v1 ou versão superior

Nota Importante: A importação e atribuição de alelos através dos ficheiros modelo só podem ser garantidas para o software GeneMapper® ID/ID-X. Se utilizar o software GeneMapper®, poderá ter problemas ao importar alguns ficheiros modelo. Nesse caso, é possível que tenha de ajustar os Painéis e Bins nas definições do seu tipo de aparelho específico, com uma ou mais execuções de escada alélica. Se precisar de ajuda, contacte-nos (support@biotype.de).

Procedimento geral de execução da análise

1. Verificar o marcador de peso molecular do ADN (Size Standard)
2. Verificar a escada alélica
3. Verificar os resultados do controlo positivo
4. Verificar os resultados do controlo negativo
5. Analisar e interpretar os resultados das amostras

4.2 Controlos

O controlo de ADN XY5 resp. XY1726 incluído no kit de ensaio, bem como outros ADN comercialmente disponíveis derivados de linhas celulares padrão, representam os seguintes alelos:

Tabela 9. Atribuição de alelos com o kit Mentype® Chimera®

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

Para fins de confirmação adicional, a tabela acima apresenta uma lista de todos os alelos de ADN de referência que podem ser adquiridos ao ATCC, bem como 3 atribuições de ADN de referência adquiridos à Coriell Cell Repositories, de acordo com o padrão definido por Szibor *et al.* (2003).

4.3 Extensão dos fragmentos e alelos

As Tabelas 10-12 apresentam a extensão dos fragmentos de cada alelo, com base no marcador de peso molecular DNA Size Standard 550 (BTO). Todas as análises foram efetuadas em sequenciadores ABI PRISM® 310/3130 Genetic Analyzer com polímero POP-4®. A utilização de outros instrumentos de análise, outros marcadores de peso molecular, ou outros polímeros, pode resultar em desvios na extensão dos fragmentos. Além disso, é recomendável que se verifique o alinhamento visual relativamente à escada alélica.

Escala

Horizontal: 70-480 bp

Vertical: Depende da intensidade do sinal

Figura 2A

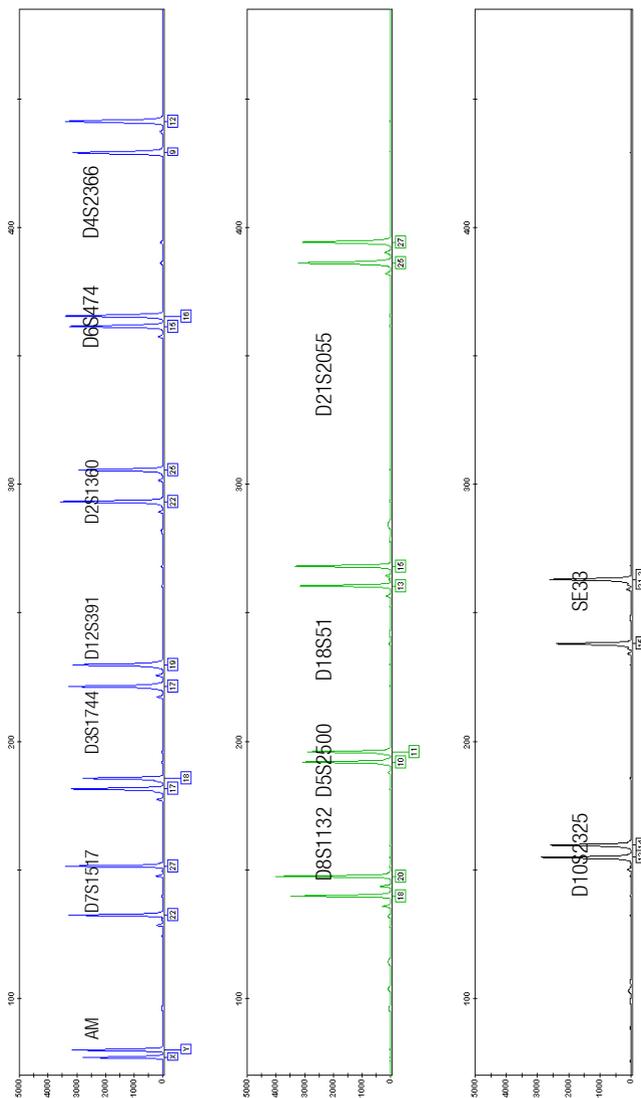


Fig. 2 Eletroferograma obtido com o kit Mentype® **Chimera**®, utilizando 500 pg de controle de ADN (A) XY5 ou (B) XY1726. A análise foi executada num sequenciador genético ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer, com o marcador de peso molecular DNA Size Standard 550 (BTO). A atribuição dos alelos foi feita utilizando o software GeneMapper® ID e os ficheiros modelo Mentype® **Chimera**®.

Figura 3

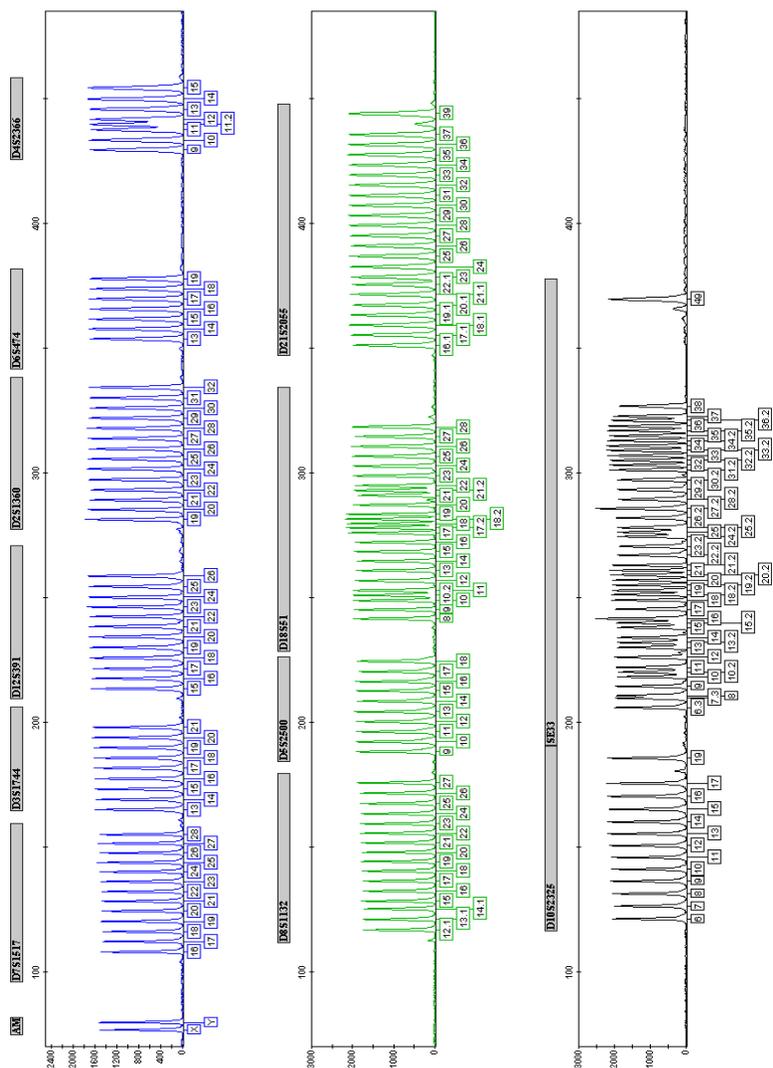


Fig. 3 Electroferograma de escada alélica obtido com o kit Mentype® **Chimera**®. A análise foi executada num sequenciador genético ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer, com o marcador de peso molecular DNA Size Standard 550 (BTO). A atribuição dos alelos foi feita utilizando o software GeneMapper® ID e os ficheiros modelo Mentype® **Chimera**®.

Tabela 10. Extensão dos fragmentos da escada alélica Mentype® **Chimera**® analisados através de um sequenciador genético ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer com polímero POP-4®. (painel azul)

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

Tabela 11. Extensão dos fragmentos da escada alélica Mentype® **Chimera**® analisados através de um sequenciador genético ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer com polímero POP-4®. (painel verde)

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

Tabela 12. Extensão dos fragmentos da escada alélica Mentype® **Chimera**® analisados através de um sequenciador genético ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer com polímero POP-4®. (painel amarelo)

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

* arredondado para números inteiros

** Os alelos "fora da escada" do agrupamento de ADN da Biotype® são atribuídos através dos ficheiros de análise modelo da Biotype® para os softwares GeneMapper® ID ou Genotyper. Se precisar de informações sobre outros alelos, consulte, entre outras fontes, http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm

‡ A fim de facilitar a orientação, estes alelos encontram-se destacados na escada alélica.

5. Interpretação dos resultados

Conforme mencionado acima, a análise pós-PCR e a atribuição automática de alelos através de um software de análise adequado permite assegurar que a discriminação dos alelos seja feita de forma precisa e fiável.

O cálculo automatizado do rácio de ADN doador/ recetor, bem como os limites de desvio padrão e deteção, podem ser obtidos diretamente a partir dos dados em bruto de uma análise de fragmentos.

Se for necessário harmonizar os resultados obtidos através do kit Mentype® **Chimera**® com os resultados de quaisquer análises citológicas, certifique-se de que as análises citológicas foram feitas com 500 leucócitos, no mínimo.

Picos “pull-up”

Se as alturas dos picos estiverem fora dos limites de deteção linear, ou se for aplicada uma matriz incorreta, poderão surgir picos “pull-up”. Esses picos aparecerão em posições de picos específicos nos canais de outras cores e, geralmente, com intensidades de sinal mais baixas.

Picos “stutter”

O aparecimento de picos “stutter” depende da sequência da estrutura de repetição e do número de alelos. Os picos n-4 são provocados pela perda de uma unidade de repetição durante a amplificação de motivos STR tetra nucleótidos, devido à ocorrência de efeitos de derrapagem na execução da Taq polimerase d ADN. A interpretação desses picos deverá ser feita em conformidade com os ficheiros modelo para os softwares Genotyper e GeneMapper® ID/ID-X.

Adição de nucleótidos de forma independente do modelo

Devido à sua atividade de transferase terminal, a polimerase de ADN Multi Taq tem tendência a acrescentar um radical de adenosina na extremidade 3' do fragmento de ADN amplificado. O artefacto de pico resultante apresenta um comprimento inferior ao expectável (picos de -1 pb). Todos os primers da Biotype® foram concebidos para minimizar o aparecimento desses artefactos. A diminuição do número de artefactos é reforçada através do passo de extensão final do protocolo de PCR, realizado a 68 °C durante 60 min. A altura dos artefactos de pico encontra-se correlacionada com a quantidade de ADN. Cada laboratório deverá definir os seus próprios limites de análise de picos.

Artefactos

A temperatura ambiente pode influenciar o desempenho dos produtos de PCR nos aparelhos multicapilares, levando ao aparecimento de picos “shoulder” ou picos “split”. Além disso, em certos casos, a atribuição automática de alelos também pode ser influenciada. Caso se verifique a ocorrência desses efeitos, recomendamos que a amostra, seja novamente injetada e que se utilize mais do que uma escada alélica por cada execução.

Influência dos polímeros

O kit Mentype® **Chimera**® foi validado e certificado para a execução de análises com opolímero POP-4®. A utilização de outros polímero (por exemplo, POP-7™ ou POP-6™) poderá influenciar

o desempenho da execução de certos produtos de PCR. Além disso, o ruído de fundo poderá aumentar, devido às diferenças de comportamento dos marcadores fluorescentes livres.

6. Dados genéticos populacionais

Os dados genéticos populacionais mais importantes de todos os marcadores STR encontram-se enumerados nas tabelas 13-16. A fórmula utilizada para calcular a informação de conteúdo de polimorfismo (PIC, do inglês "**Polymorphism Information Content**") foi publicada por Botstein *et al.* (1980), a fórmula de cálculo da heterozigose expectável (HET, do inglês "**Expected Heterozygosity**") por Nei e Roychoudhury *et al.* (1974), e a fórmula de cálculo da capacidade de discriminação (PD, do inglês "**Power of Discrimination**") pode ser consultada na obra de Jones *et al.* (1972). Todas as fórmulas são adequadas para marcadores autossômicos.

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

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

$$PD = 1 - \sum_i f_i^2$$

Tabela 13. Dados genéticos populacionais

Marcador D2S1360		Marcador D3S1744		Marcador D4S2366	
Alelo	Frequência alélica	Alelo	Frequência alélica	Alelo	Frequência alélica
19	0,007	13	0,007	9	0,347
20	0,126	14	0,104	10	0,179
21	0,060	15	0,053	11	0,074
22	0,309	16	0,100	12	0,147
23	0,142	17	0,319	13	0,168
24	0,098	18	0,197	14	0,074
25	0,086	19	0,130	15	0,011
26	0,093	20	0,067		
27	0,035	21	0,023		
28	0,023				
29	0,012	PIC	0,790	PIC	0,760
30	0,002	PD	0,943	PD	0,919
31	0,005	HET	0,792	HET	0,795
32	0,002				
PIC	0,820				
PD	0,955				
HET	0,856				

Tabela 14. Dados genéticos populacionais

Marcador D5S2500		Marcador D6S474		Marcador D7S1517	
Alelo	Frequência alélica	Alelo	Frequência alélica	Alelo	Frequência alélica
9	0,007	13	0,246	16	0,007
10	0,084	14	0,212	17	0,007
11	0,313	15	0,154	18	0,049
12	0,161	16	0,285	19	0,120
13	0,061	17	0,097	20	0,101
14	0,042	18	0,005	21	0,099
15	0,213			22	0,082
16	0,103	PIC	0,740	23	0,077
17	0,009	PD	0,918	24	0,155
18	0,007	HET	0,733	25	0,230
				26	0,054
PIC	0,780			27	0,014
PD	0,938			28	0,005
HET	0,804				
				PIC	0,860
				PD	0,967
				HET	0,826

Tabela 15. Dados genéticos populacionais

Marcador D8S1132		Marcador D10S2325		Marcador D12S391	
Alelo	Frequência alélica	Alelo	Frequência alélica	Alelo	Frequência alélica
16	0,007	6	0,002	15	0,035
17	0,095	7	0,102	16	0,019
18	0,221	8	0,056	17	0,107
19	0,153	9	0,121	17,3	0,019
20	0,128	10	0,142	18	0,215
21	0,119	11	0,144	18,3	0,007
22	0,133	12	0,193	19	0,121
23	0,077	13	0,133	19,3	0,016
24	0,056	14	0,065	20	0,117
25	0,005	15	0,037	21	0,093
26	0,005	16	0,005	22	0,114
27	0,002			23	0,072
		PIC	0,860	24	0,040
PIC	0,850	PD	0,967	25	0,021
PD	0,964	HET	0,851	26	0,002
HET	0,828				
				PIC	0,870
				PD	0,971
				HET	0,893

Tabela 16. Dados genéticos populacionais

Marcador D18S51		Marcador D21S2055		Marcador SE33 (ACTBP2)	
Alelo	Frequência alélica	Alelo	Frequência alélica	Alelo	Frequência alélica
10	0,005	16,1	0,056	11	0,002
12	0,103	17,1	0,021	12	0,014
13	0,110	18,1	0,023	13	0,002
14	0,157	19,1	0,274	13,2	0,002
15	0,199	20,1	0,040	14	0,026
16	0,161	21,1	0,019	15	0,049
17	0,112	22,1	0,005	16	0,047
18	0,072	23	0,007	17	0,070
19	0,028	25	0,112	17,3	0,002
20	0,030	26	0,116	18	0,044
21	0,021	27	0,016	18,3	0,002
24	0,002	28	0,007	19	0,082
		29	0,030	19,2	0,009
PIC	0,850	30	0,021	20	0,044
PD	0,964	31	0,023	20,2	0,009
HET	0,902	32	0,026	21	0,035
		33	0,067	21,2	0,019
		34	0,074	22	0,007
		35	0,053	22,2	0,035
		36	0,007	23,2	0,023
		37	0,002	24	0,002
				24,2	0,035
		PIC	0,870	25,2	0,044
		PD	0,971	26,2	0,040
		HET	0,856	27,2	0,084
				28,2	0,084
				29,2	0,051
				30	0,002
				30,2	0,061
				31,2	0,028
				32,2	0,023
				33	0,009
				33,2	0,005
				34	0,002
				36	0,002
				PIC	0,950
				PD	0,990
				HET	0,949

Todos os dados genéticos populacionais são baseados num estudo realizado pela Biotype GmbH em cerca de 210 caucasianos europeus sem grau de parentesco.

7. Referências

- Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayr W, Olaisen B (1997)** DNA Recommendations. Further report of the DNA commission of the ISFG regarding the use of short tandem repeat systems. *Int J Legal Med* 110:175-176.
- Becker D, Vogelsang D, Brabetz W (2007)** Population data on the seven short tandem repeat loci D4S2366, D6S474, D14S608, D19S246, D20S480, D21S226 and D22S689 in a German population. *Int J Legal Med* 121:78-81.
- Botstein D, White RI, Skolnick M, Davis RW (1980)** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331.
- Hering S, Müller E (2001)** New allele and mutational events in D12S391 and D8S1132: sequence data from an eastern German population. *Forensic Sci Int* 124:187-191.
- Jones DA (1972)** Blood samples: Probability of Discrimination. *J Forensic Sci Soc* 12:355-359.
- Nei M, Roychoudhury AK (1974)** Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76:379–390.
- Szibor R, Edelmann J, Hering S, Plate I, Wittig H, Roewer L, Wiegand P, Cali F, Romano V, Michael M (2003)** Cell line DNA typing in forensic genetics – the necessity of reliable standards. *Forensic Sci Int* 138: 37-43.
- Wiegand P, Lareu M. V., Schürenkamp M (1999)** D18S535, D1S1656 and D10S2325: three efficient short tandem repeats for forensic genetics. *Int J Legal Med* 112:360-363.
- Wiegand P, Klintschar M (2002)** Population genetic data, comparison of the repeat structure and mutation events of two short STRs. *Int J Legal Med* 116:258-261.

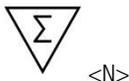
8. Explicação dos Símbolos



Fabricante



Número do lote:



Suficiente para <N> testes



**Consultar o Manual de Instruções
(Manual)**



Prazo de Validade



**Limites de Temperatura de
Armazenamento**



Número de catálogo



Dispositivo de Diagnóstico *In Vitro*



Proteger da luz



Manter seco

Especificações: kit de amplificação por PCR Mentype® Chimera®

A Validação analítica

A a) Determinação do padrão de reação e tolerância específica do lote

Objetivo: Determinar o padrão de reação e as tolerâncias específicas do lote de produção de PCR multiplex, bem como a respetiva linha de base, em termos de alturas relativas de sinal (RFU) e equilíbrio das alturas de sinal.

Metodologia: O kit de ensaio contém ADN de controlo (heterozigótico, na maioria dos sistemas de STR). A reação padrão foi obtida através de determinações quádruplas, utilizando o controlo de ADN com uma concentração nominal de 500 pg. Adicionalmente, foram aplicados quatro valores em branco (sem controlo modelo, NTC) isentos de ADN.

Resultados: No que se refere a misturas de primers específicas para cada lote, foram estabelecidas as seguintes especificações: Utilizando um sequenciador genético ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer, obtêm-se sinais com alturas de 1 000-4 000 RFU, e através da utilização de um sequenciador genético ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer, obtêm-se sinais com alturas de 1 000-5 000 RFU. Em sistemas heterozigóticos, as flutuações nas alturas dos sinais não poderão ser superiores a 30 % relativamente aos valores de referência. No intervalo de análise, não foram observados sinais não específicos ≥ 50 RFU (linha de base) associados aos valores em branco (NTC).

A b) Precisão da genotipagem

Objetivo: A precisão da alocação dos alelos foi estatisticamente comprovada em condições padrão. O teste verifica a atribuição automática de alelos relativamente à escada alélica, bem como a concordância da atribuição de alelos, comparativamente à tipificação prévia das amostras de ADN após terem sido analisadas por outros métodos (outros kits de PCR, sequenciação direta, etc.). A partir desses resultados, foram estabelecidas as configurações específicas do dispositivo para o ensaio de genotipagem por eletroforese capilar em gel ("bins" e painéis) e a proporção de picos "stutter" para os modelos sequenciador de ADN.

Metodologia: Foram testadas 80 amostras de ADN humano pré- tipificado de várias origens (sangue, esfregaços de bochecha) através de ensaios de determinação individualizados. Adicionalmente, foi levado a cabo um ensaio em branco (sem ADN). Os critérios de aceitação foram definidos como perfis completos, com alturas de pico ≥ 50 RFU (avaliação manual).

Resultados: Após a determinação das configurações do dispositivo específicas para o ensaio, procedeu-se à atribuição, a todas as amostras de ADN, dos genótipos corretos para todos os sistemas STR e para o marcador de amelogenina.

A c) Especificidade analítica

Objetivo: O objetivo deste estudo consiste em assegurar a exclusão de resultados falsos positivos que possam vir a ocorrer em consequência de situações de reatividade cruzada com determinadas amostras de ADN não humano. No entanto, na prática clínica, o ADN não humano pode ser excluído, em grande parte, através dos cuidados de preservação da esterilidade na recolha das amostras.

Metodologia: Foram testados 2,5 ng de ADN genómico de *Bos Taurus* (bovino), *Sus scrofa domestica* (suíno), *Canis lupus familiaris* (cão), *Felis catus* (gato) e *Oryctolagus cuniculus* (coelho doméstico). Esse ADN de origem animal foi obtido a partir de amostras de sangue fornecidas como material residual de estudos veterinários.

Resultados: Não foi detetada qualquer reatividade cruzada na área alélica (< 200 RFU).

A d) Sensibilidade analítica

Objetivo: Determinação do limite de detecção analítica (sensibilidade).

Metodologia: Foram feitos testes em quadruplicado a uma série de amostras de ADN de referência com diluições entre 500 pg e 31,5 pg. Como critério de aceitação, foi definido o seguinte: perfis completos com valores ≥ 200 RFU.

Resultados: Foi determinado um limite de detecção de 200 pg de ADN genómico.

A e) Diferenças de comportamento nos ensaios realizados com termocicladores distintos

Objetivo: Os termocicladores de PCR de fabricantes diversos apresentam diferenças nas respetivas especificações. Nomeadamente, podem ser observadas diferenças nas taxas de aquecimento/arrefecimento, bem como nas técnicas de controlo de temperatura.

Metodologia: Foram testadas reações padrão com controlo de ADN à concentração nominal de 500 pg, em determinações quádruplas, com a mesma mistura principal, utilizando sempre 2 amostras em branco (sem ADN, NTC), nos seguintes termocicladores: Thermocycler *GeneAmp 9700* com Alu-block (Life Technologies, Division Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt), *GeneAmp 9700* com Silver-block (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt), DNA Engine (PTC-200) Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München), *Biometra T1* (Biometra GmbH, Göttingen), *Techne[®] TC-512 Thermal Cycler* (biostep GmbH, Jahnsdorf) e *Eppendorf Mastercycler ep-S* (Eppendorf AG, Hamburg).

Resultados: Não foram detetados quaisquer subprodutos não específicos com valores ≥ 200 RFU. O desvio média de da altura dos picos relativamente à reação padrão foi de 20 %, a uma rampa predefinida de 2 °C/seg.

A f) Amostras de ADN misturado

Objetivo: O objetivo da análise de quimerismo após situações de transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas consiste em efetuar a deteção e quantificação relativa das frações de ADN correspondentes ao doador e ao recetor. Para detetar quaisquer vestígios residuais mínimos da doença, terá de ser possível detetar as quantidades mais pequenas possíveis de ADN do recetor ou doador nas amostras de ADN misturado.

Metodologia: Foram preparadas e testadas três misturas independentes, obtidas a partir de duas amostras de ADN, nas quais o ADN deficitário foi utilizado a 0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 30 % e 50 %. Os ADN incluídos nas misturas mostraram pelo menos três loci STR com 4 alelos informativos. Em cada caso, foram testadas paralelamente, respeitando o protocolo de reação padrão, amostras de 1 ng de cada uma das 4 misturas de ADN. Foram avaliadas alturas de intensidade de sinal de, pelo menos, 50 RFU.

Resultados: A apresentação dos resultados é feita na Figura 4. No que se refere ao ADN deficitário, foi possível alcançar um limite de deteção de 1 %. Isso corresponde aos valores de 1-5 % alcançados através da utilização de kits de STR para fins forenses convencionais, quando empregues em análises de quimerismo.

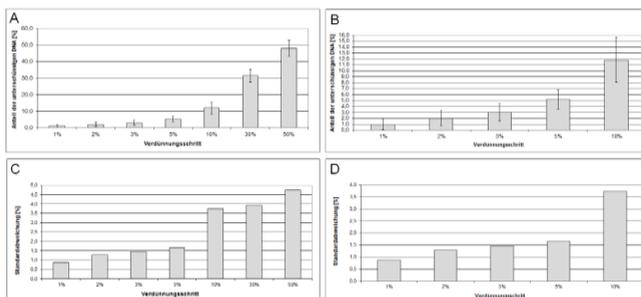


Fig. 4: Teste de misturas de ADN. (A, B). Valores médios e desvio padrão das frações de ADN presentes em menor quantidade, calculados a partir do desvio padrão das alturas de sinal da eletroforese capilar (C, D) relativamente a B

A g) Temperaturas de recozimento de PCR

Objetivo: A fim de determinar a robustez da PCR, foram simuladas flutuações de temperatura de recozimento dos primers da PCR multiplex. Esta etapa de utilização da temperatura é essencial para garantir a sensibilidade e especificidade da PCR.

Metodologia: Foram introduzidas ± 1 °C e ± 2 °C na temperatura de recozimento específica do kit relativamente aos parâmetros de reação padrão com controlo de

ADN e concentração nominal de 500 pg. Foi efetuada uma determinação tripla com a mesma mistura principal.

Resultados: Não foram detectados subprodutos não específicos com valores ≥ 200 RFU a temperaturas de ± 1 °C. A média das alturas dos picos apresentou um desvio máximo de ± 30 % relativamente à reação padrão a ± 1 °C. Não foi detetada qualquer falha de sinal alélico < 200 RFU a temperaturas de ± 2 °C.

A h) Flutuação dos lotes de tampões de PCR

Objetivo: Os rácios de concentração dos componentes do tampão de reação de PCR Reaction Mix A (dNTPs e, concentrações iónicas, nomeadamente de Mg^{2+}) são essenciais para garantir a sensibilidade, especificidade e equilíbrio dos sinais nas PCR multiplex. Por conseguinte, a determinação da robustez do teste é feita por comparação com as flutuações do lote de tampões de PCR fornecido no kit.

Metodologia: Foram testados três lotes independentes da mistura de reação Reaction Mix A, a fim de aferir o seu desempenho na reação padrão com controlo de ADN à concentração nominal de 500 pg.

Resultados: Não foram detetados subprodutos não específicos com valores ≥ 50 RFU. O desvio máximo das médias de altura dos picos comparativamente à reação padrão foi de 20 %.

A i) Inibidores de PCR

Objetivo: Se não for totalmente removida durante o processo de purificação do ADN a partir do sangue total estabilizado, a hematina da hemoglobina constitui um potente inibidor da Taq DNA polimerase.

Metodologia: O efeito da hematina porcina (Sigma-Aldrich, Freiburg) foi testado numa concentração final de 0-250 μM submetida a uma reação padrão com controlo de ADN à concentração nominal de 500 pg.

Resultados: Foi possível obter perfis completos (≥ 50 RFU) com uma concentração final de inibidor de *hematina porcina* de até 100 μM . A partir dos 150 μM , deixou de ser possível obter perfis completos (apenas parciais).

A j) Estabilidade durante a utilização

Objetivo: A estabilidade dos reagentes do kit de PCR foi testada na sequência de vários ciclos repetidos de congelação e descongelação.

Metodologia: O kit de reagentes foi submetido a 20 ciclos de congelação e descongelação. A congelação foi feita durante pelo menos 1 h a -20 °C. A mistura foi descongelada à temperatura ambiente e os reagentes foram homogeneizados por agitação antes de se proceder à respetiva utilização. Posteriormente, foi preparada uma reação padrão com controlo de ADN à concentração nominal de 500 pg, bem

como duas amostras em branco isentas de ADN, em processos de determinação triplicados. A avaliação foi feita por comparação com uma reação padrão obtida sem passar pelo ciclo de congelação descongelação.

Resultados: O desvio máximo da média de alturas dos picos comparativamente ao valores obtidos através da reação padrão foi de 20 % (nomeadamente, no que se refere à perda de sinal). Não foram encontrados picos adicionais > 50 RFU no intervalo de análise dos valores em branco.

B Dados de desempenho clínico

B a) Desenho do estudo, aspectos éticos e regulamentares

O estudo de desempenho clínico foi efetuado nos termos dos parágrafos 20-24 do German Medizinproduktegesetz. O protocolo foi aprovado pela BfArM, a autoridade competente a nível nacional, nos termos do parágrafo 7 do German Verordnung über klinische Prüfungen von Medizinprodukten, e em conformidade com as diretrizes estabelecidas pela comissão de ética institucional. Todos os participantes assinaram uma declaração de consentimento livre e esclarecido.

B b) Métodos de referência

A diferenciação citogenética dos leucócitos do doador e do recetor através de hibridização por fluorescência in situ (FISH) serviu de teste para fins comparativos. Foi utilizado o kit específico de sexo-cromossoma CE-IVD CEP® X SpectrumOrange™ / Y SpectrumGreen™ Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

B c) Extração e purificação de ADN

A extração de ADN a partir de amostras de sangue total heparinizadas foi efetuada com o kit QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

B d) Resultados

Procedeu-se à recolha de um total de 103 conjuntos de dados de pacientes adultos durante vários dias após o transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas ou de medula óssea. Uma vez que os pares doador-recetor apresentavam diferenças género, foram analisados com recurso à metodologia FISH específica para cromossomas sexuais. Para cada reação de PCR, foi utilizado, pelo menos, 1,5 ng de ADN genómico. Antes de mais, procedeu-se à determinação dos sistemas STR informativos dos pares doador-recetor e confirmou-se o género através

da genotipagem do marcador de amelogenina, faz parte da PCR multiplex. Os resultados da PCR foram aferidos através da utilização dos valores médios das alturas de sinal de todos os STR informativos (pelo menos 2). A Figura 5 apresenta o resumo dos resultados da análise de concordância.

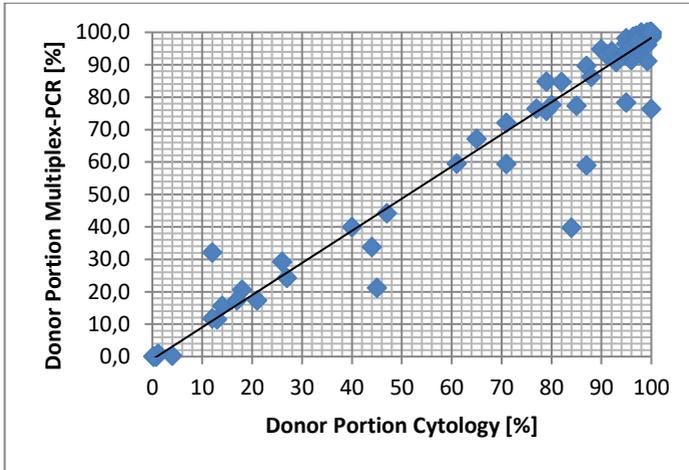


Fig. 5: Análise de concordância dos dados da PCR multiplex comparativamente aos dados citológicos.

Em 92 dos 103 conjuntos de dados (90,3 %) o desvio dos resultados da PCR multiplex, comparativamente aos da análise citogenética, foi inferior a 5 %. Só foram observados desvios superiores nos casos em que a análise citogenética foi realizada com uma quantidade total de células igual ou inferior a 500. Segundo as recomendações do fabricante do kit de FISH, a contagem de células deverá ser de, pelo menos, 200 unidades. No entanto, de acordo com as recomendações práticas, as quantidades absolutas de células mais elevadas (500-1 000) proporcionam melhores resultados para fins de análise citogenética [1, 2].

B e) Referências

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

Biotype GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 Dresden

Tel. +49 351 8838 400

Fax +49 351 8838 403

info@biotype.dewww.biotype.de