

Mentype[®] Chimera[®]

Instrucțiuni de utilizare

Noul standard pentru analiza himerismului

Pentru uz diagnostic in vitro



CHNIFU01v1ro
Mai 2020



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



Număr lot



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
D-01109 Dresden
Germania

Fabricat în Germania

Biotype GmbH dezvoltă, produce și comercializează kiturile proprii de detecție rapidă Mentype®, bazate pe metoda PCR. Produsele noastre oferă clienților metode de testare rapide și sigure pentru diagnostic medical profesionist.

Kiturile noastre de testare Mentype® garantează cele mai înalte standarde de calitate pentru cercetare clinică și diagnostic.

Pentru informații și întrebări legate de kitul de amplificare PCR Mentype® **Chimera**®, nu ezitați să ne contactați sau vizitați www.biotype.de

Mentype® Chimera®

Descrierea produsului

Mentype® Chimera® este o aplicație multiplex-PCR dezvoltată special pentru monitorizarea himerismului după transplant de celule stem din sânge, respectiv de măduvă osoasă. Testul a fost validat prin analiza himerismului a peste 200 de perechi corelate prin HLA (HLA-matched) de donator-receptor înrudiți și oportunitatea lui a fost confirmată într-un studiu comparativ de evaluare clinică. Testul se utilizează de atunci cu succes pentru diagnostic de rutină.

Markerii genetici vizați de Mentype® Chimera® sunt distribuiți pe 12 cromozomi și reprezintă repetiții de secvențe scurte în tandem (STR) cu polimorfism ridicat, rată foarte mare de heterozigotitate și distribuție alelică echilibrată. Împreună, acestea cresc semnificativ posibilitatea de identificare a locilor de informare pentru diferențierea donator-receptor și asigură încrederea și robustețea analizelor de himerism.

O reacție PCR amplifică simultan locii autozomiali **D2S1360, D3S1744, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517, D8S1132, D10S2325, D12S391, D18S51, D21S2055, SE33 (ACTBP2)**, și locusul amelogenină care are specificitate de sex. Pentru fiecare locus se marchează fluorescent cu **6-FAM, BTG** sau **BTY un primer**.

Limita de detecție a kitului de amplificare prin PCR Mentype® Chimera® este de **200 pg ADN genomic**. Intervalul optim în condiții standard este de **0,2-1,0 ng ADN**.

Kitul de testare a fost validat prin utilizarea sistemului GeneAmp® PCR 9700 Aluminium, a Eppendorf Mastercycler ep-S, a Biometra T1 și a analizatoarelor genetice ABI PRISM® 310 și ABI PRISM® 3130, cu aplicare de polimer POP-4®.

Cuprins

1. Descrierea produsului Mentype® Chimera®	5
2. Amplificarea PCR	8
2.1 Prepararea soluției Master mix.....	8
2.2 Parametri de amplificare PCR.....	9
3. Electroforeza capilară în gel	10
3.1 Prepararea produșilor PCR.....	10
3.2 Analiza lungimii fragmentelor	10
4. Analiza	12
4.1 Fișiere matrice Biotype®	12
4.2 Controale	13
4.3 Lungimea fragmentelor și alelelor.....	14
5. Interpretarea rezultatelor	20
6. Date de genetică a populației	21
7. Referințe	24
8. Explicarea simbolurilor	25
A Validare analitică	26
A a) Determinarea reacției standard și a toleranței cu specificitate de lot	26
A b) Acuratețea genotipării	26
A c) Specificitatea analitică	27
A d) Sensibilitatea analitică	27
A e) Performanța de testare cu diferiți termociclatori PCR	27
A f) Probe de ADN mixt	28
A g) Temperaturi de aliniere PCR.....	28
A h) Fluctuații ale loturilor de tampon PCR	29
A i) Inhibitori de PCR.....	29
A j) Stabilitatea la utilizare	29
B Date de eficiență clinică	30
B a) Designul de studiu, aspecte de etică și legislație	30
B b) Metode de referință	30
B c) Extracția și purificarea ADN-ului.....	30
B d) Rezultate	30
B e) Referințe	31

1. Descrierea produsului Mentype® Chimera®

Tabelul 1. Informații locus-specifice pentru Mentype® Chimera®

Locus	Număr de inventar GenBank	„Motivul” repetitiv al alelei de referință	Alela de referință	Interval alele
Amelogenina X	M55418			
Amelogenina Y	M55419			
D2S1360	G08130	[TATC] ₉ [TGTC] ₉ [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 CTAA [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

Tabelul 1 prezintă locii STR cu „motivele” repetitive și alelele corespunzătoare, în concordanță cu normele de ghidare pentru utilizarea markerilor microsatelit, elaborate de Societatea Internațională de Genetică Judiciară (ISFG; Bär *et al.*, 1997). Nomenclatura pentru locii STR D8S1132 și D12S391 este în conformitate cu Hering și Müller (2001), pentru locii D4S2366 și D6S474 cu Becker *et al.* (2007), pentru locusul D10S2325 cu Wiegand *et al.* (1999), iar nomenclatura pentru locusul D7S1517 este în conformitate cu Wiegand și Klintschar (2002). Intervalele de alele includ toate alelele recunoscute de către Institutul Național pentru Standarde și Tehnologie (NIST, la data 12/2008) și în literatura actuală.

Tabelul 2. Mapare cromozomială pentru Mentype® Chimera®

Locus	Mapare cromozomială
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

Conținutul kitului

Kitul Mentype® **Chimera**® pentru amplificarea PCR

Component	Reactiv	Volum per dimensiune ambalaj		
		25 de reacții	100 de reacții	400 de reacții
Nuclease-Free Water	Apă fără nucleaze	1,5 mL	2x 1,5 mL	6x 1,5 mL
Reaction Mix A	Amestec de reactivi A	125 µL	500 µL	2x 1,0 mL
Mentype® Chimera ® Primer Mix	Amestec primer Mentype® Chimera ®	63 µL	250 µL	4x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Multi Taq 2 ADN Polimerază	10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® Chimera ® Control DNA XY5 (2 ng/µL)	ADN XY5 de control Mentype® Chimera ® (2 ng/µL)	10 µL	10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	ADN Standard de mărime 550 (BTO)	13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® Chimera ® Allelic Ladder	Scală de alele Mentype® Chimera ®	25 µL	25 µL	4x 25 µL

A se avea în vedere că nu trebuie amestecate componente din kituri cu loturi diferite. Un rezumat al numerelor de lot se regăsește pe eticheta aflată pe interiorul clapetei cutiei. Nu este permisă divizarea componentelor kitului în alte vase de reacție.

Informații privind comanda

Notă: Ambalajul cu 1000 de reacții nu mai este disponibil pentru comandă.

Produs	Dimensiune ambalaj	Comandă
Mentype® Chimera ®	25 de reacții	45-13210-0025
Mentype® Chimera ®	100 de reacții	45-13210-0100
Mentype® Chimera ®	400 de reacții	45-13210-0400

Păstrare

Păstrați toate componentele la temperaturi între -25 °C și -15 °C și evitați dezghețarea și înghețarea repetate. Amestecul primer și scala de alele trebuie păstrate într-un loc ferit de lumină. Probele de ADN și reactivii post-PCR (scala alelică și standardul de mărime ADN) trebuie păstrate separat de reactivii PCR. Data de expirare este indicată pe capacul kitului.

Reactivi suplimentari

Reactivii suplimentari necesari pentru utilizarea kitului de amplificarea Biotype® PCR:

Tabelul 3. Reactivi suplimentari necesari pentru Mentype® **Chimera**®

Reactiv	Furnizor	Comandă
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

Avertismente și instrucțiuni de securitate

Kitul de amplificare prin PCR conține următoarele substanțe chimice potențial periculoase:

Component	Substanță	Pericole
Reaction Mix A	Azidă de sodiu NaN_3	toxic la înghițire, produce gaze toxice la contact cu acizi

Citiți toate fișele cu date de securitate (FTS) pentru toate produsele Biotype®, disponibile la cerere. Vă rugăm contactați producătorii respectivi pentru copii ale FTS-urilor oricărui reactivi suplimentari.

Asigurarea calității

În cadrul Biotype GmbH toate componentele kitului sunt supuse unui proces intensiv de asigurare a calității. Calitatea kiturilor de testare este monitorizată în permanență pentru a se asigura posibilitatea de utilizare nerestricționată. Vă rugăm să ne contactați pentru orice întrebare legată de asigurarea calității.

Mărci înregistrate și brevete

Mentype® și Chimera® sunt mărci înregistrate ale Biotype GmbH.

ABI PRISM®, GeneMapper®, GeneAmp® și Applied Biosystems® sunt mărci înregistrate ale Applied Biosystems LLC.

Conform legilor Europene, POP-4® este marcă înregistrată a Applied Biosystems LLC. În SUA, POP-4® este marcă înregistrată a Life Technologies Corporation.

Metoda PCR este asigurată prin brevet. Deținătorii brevetului sunt Hoffmann-La Roche Inc. și F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Protocoloale pentru amplificarea PCR, electroforeză și analiză

2. Amplificarea PCR

2.1 Prepararea soluției Master mix

Tabelul de mai jos prezintă volumele tuturor reactivilor PCR per 25 μL volum de reacție, care include 1,0 μL de probă (ADN matrită). Numărul de reacții prevăzute se va determina luând în calcul reacțiile de control pozitiv și negativ. Adăugați la acest număr una-două reacții, pentru a compensa erorile de pipetare.

Tabelul 4. Abordarea soluției master mix PCR pentru Mentype® Chimera®

Componentă	Volum
Nuclease-Free Water	16,1 μL
Reaction Mix A*	5,0 μL
Mentype® Chimera® Primer Mix	2,5 μL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2.5 U/ μL)	0,4 μL
Volumul soluției master mix	24,0 μL

* conține Mg^{2+} , nucleotide dNTP, albumină serică bovină

Toate componentele trebuie amestecate (vortex) și centrifugate timp de aproximativ 10 secunde înainte de prepararea soluției master mix. Volumul de ADN aplicat depinde de concentrația sa. Pentru probe de referință este în general suficient 1 μL . Pentru probele pacienților critici cantitatea de matrită poate fi crescută corespunzător. Aduceți volumul final de reacție la 25 μL cu apă fără nucleaze.

În general, matrităle de ADN trebuie păstrate în apă fără nucleaze sau în soluție tampon TE diluată (10 mM Tris HCl, pH 8,0 și 1 mM EDTA), de exemplu 0,1 x tampon TE.

Amestecurile primer sunt ajustate pentru a produce vârfuri echilibrate la 30 cicluri PCR și **0,5 ng ADN XY5** de control, într-un volum de reacție de 25 μL . Dacă se aplică mai multă matrită ADN, se așteaptă vârfuri (peak-uri) mai înalte pentru fragmente PCR mici și vârfuri (peak-uri) relativ mici pentru fragmente mari. Pentru a corecta acest dezechilibru, reduceți cantitatea de ADN matrită.

Controlul pozitiv

Pentru a obține controlul de amplificarea pozitiv, diluați ADN XY5 de control la 0,5 ng/ μL .

În locul ADN-ului matrită, pipetați ADN-ul de control diluat într-o eprubetă de reacție care conține amestecul master pentru PCR.

Controlul negativ

Pentru a obține controlul de amplificarea negativ, pipetați apă fără nucleaze în locul ADN-ului matrită într-o eprubetă de reacție care conține amestecul master pentru PCR.

ADN-ul matrită

Uneori, concentrația măsurată a ADN-ului variază în funcție de metoda de cuantificare utilizată. De aceea, pentru a obține rezultate optime este posibil să fie necesară ajustarea cantității de ADN.

2.2 Parametri de amplificare PCR

Efectuați un PCR cu „start fierbinte” pentru a activa Multi Taq 2 ADN Polimeraza și pentru a preveni formarea de produși de amplificare nespecifici.

Numărul de cicluri PCR depinde de cantitatea de ADN aplicată. Pentru toate probele se recomandă 30 cicluri PCR. În cazul probelor critice (< 100 pg ADN), numărul de cicluri PCR poate fi crescut la 32.

Metoda standard

Recomandată pentru toate probele de ADN

Tabelul 5. Protocolul standard de amplificare PCR pentru Mentype® Chimera®

Temperatură	Timp	
94 °C	4 min („start fierbinte” pentru activarea Multi Taq2 ADN Polimerazei)	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	30 cicluri
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	oprire

Opțional

Recomandată pentru cantități mici de ADN

Tabelul 6. Protocolul opțional de amplificare PCR pentru cantități mici de ADN

Temperatură	Timp	
94°C	4 min („start fierbinte” pentru activarea Multi Taq2 ADN Polimerazei)	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	32 cicluri
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	oprire

Notă: Dacă se utilizează termociclatori cu pași rapizi de încălzire și răcire (> 2 °C/s), urcarea trebuie ajustată la 2 °C/s pentru a se asigura un echilibru optim al kitului.

Cantități foarte mici de ADN pot să ducă la valori statistice inutilizabile și dezechilibre ale peak-urilor. Creșterea numărului de cicluri PCR duce la risc crescut de contaminare încrucișată cauzată de cantități minime de impurități. Mai mult, pot să apară produși nespecifici de amplificare.

3. Electroforeza capilară în gel

3.1 Prepararea produșilor PCR

După finalizarea procesului PCR, scoateți probele din ciclor și centrifugați scurt. Dezghețați reactivii Hi-Di™ Formamide (nu sunt incluși în kit) și Standard ADN de mărime 550 (BTO), amestecați și centrifugați scurt eprubetele. Preparați varianta descrisă în Tabelul 7, constând în Hi-Di™ Formamide și Standard ADN de mărime 550 (BTO), adăugați una sau două reacții pentru a compensa variațiile de pipetare.

Tabelul 7. Amestecul denaturant conținând Hi-Di™ Formamidă și ADN Standard de mărime 550 (BTO)

Componentă	Volum per reacție
Hi-Di™ Formamidă	12,0 μL
Standard ADN de mărime 550 (BTO)	0,5 μL

Pipetați 12 μL din amestecul denaturant de formamidă și BTO în numărul corespunzător de godeuri ale plăcii de PCR (potrivită pentru utilizare în analizorul genetic). Adăugați apoi în godeu 1 μL produs de PCR sau 1 μL scală alelică Mentype® **Chimera**®.

Acoperiți placa de PCR cu o folie potrivită, vortexați și apoi centrifugați scurt placa.

Notă: Scala alelică se utilizează pentru a determina corect fragmentele analizate în cadrul analizei datelor. În fiecare ciclu de analiză a lungimii fragmentelor, scala alelică trebuie analizată cel puțin o dată pentru a asigura succesul analizei datelor.

Notă: Capilarele dispozitivului de electroforeză în gel nu trebuie să ruleze niciodată „pe uscat”. Dacă probele nu ocupă toate capilarele, umpleți godeurile suplimentare ale plăcii cu 12 μL Hi-Di™ Formamidă, conform numărului de capilare.

Denaturați produșii de PCR într-un ciclor PCR timp de 3 minute la 95 °C, apoi răciți probele la 4 °C în ciclor. Centrifugați scurt probele înainte de analiza de lungime a fragmentelor.

3.2 Analiza lungimii fragmentelor

După efectuarea cu succes a calibrării spectrale a dispozitivului de electroforeză capilară în gel cu reactivul Matrix Standard BT5 (Biotype GmbH), creați un modul specific de funcționare (ABI 310, ABI 3130) sau un protocol instrumental (ABI 3500) cu următorii parametri:

Tabelul 8. Parametri specifici pentru modulul de funcționare, respectiv pentru protocolul instrumental al dispozitivului de electroforeză capilară în gel

	ABI 310	ABI 3130	ABI 3500
Injecții Voltaj [kV]	15,0	3,0	3,0
Timp de funcționare	28 min	1560 s	1560 s
Timp de injecție [s]	5	10	10

Diferit de valorile din Tabelul 8, timpul de funcționare poate fi ajustat pentru analiza tuturor fragmentelor (60-550 bp) de ADN Standard de mărime 550 (BTO)

Notă: Urmați instrucțiunile de utilizare date de producătorul dispozitivului de electroforeză capilară în gel pentru a seta parametrii de funcționare specifici.

Notă: Consultați, de asemenea, și fluturașii cu informații suplimentare pentru calibrarea și aplicațiile produselor Mentype® la instrumentele de electroforeză capilară în gel. Aceștia sunt furnizați de către Biotype GmbH la cerere pe adresa support@biotype.de.

4. Analiza

Pentru instrucțiuni generale despre analiza automată a probelor, consultați manualele de utilizare a software-urilor *GeneScan*[®] sau *GeneMapper*[®] ID sau *GeneMapper*[®] ID-X.

Notă: La Mentype[®] **Chimera**[®], panelul roșu trebuie să fie decolorat.

Determinarea lungimii exacte a produșilor de amplificare depinde de tipul de dispozitiv, de condițiile de electroforeză, precum și de standardul ADN de lungime utilizat. Datorită complexității unor loci STR, determinarea mărimii ar trebui să se bazeze pe referințe distribuite uniform. Astfel, Standardul de mărime ADN 550 (BTO) trebuie utilizat cu următoarele lungimi de fragmente: **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, și 550 bp.**

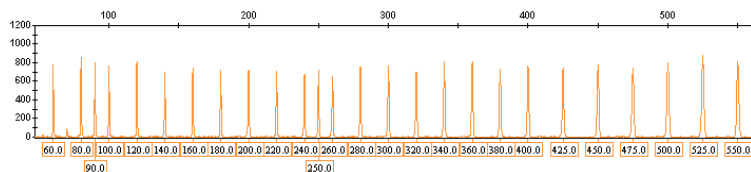


Fig. 1

Electroferograma Standardului de mărime ADN 550 (BTO), fragmentele cu lungimile în bp

Notă: Matricile pentru Standardul de mărime ADN SST-BTO_60-500bp furnizate pot fi aplicate pentru evaluarea și analiza Mentype[®] **Chimera**[®] folosindu-se software-ul *GeneMapper*[®] ID sau ID-X.

4.1 Fișiere matrice Biotype[®]

Alocarea alelelor trebuie efectuată cu un software de analiză corespunzător, de exemplu *GeneMapper*[®] ID/ID-X sau *Genotyper* în combinație cu fișierele matrice Mentype[®] **Chimera**[®] de la Biotype GmbH. Fișierele matrice Biotype[®] sunt disponibile pentru descărcare de pe pagina noastră (www.biotype.de) sau pe CD, la cerere.

Matricile Biotype® recomandate pentru software-ul GeneMapper® ID/ID-X sunt:

Panеле	Chimera_Panels_v1/v1X	Sau versiuni mai noi
BinSets	Chimera_Bins_v1/v1X	sau versiuni mai noi
Standard de mărime	SST-BT0_60-500bp	
Metoda de analiză	Analysis_HID_310	
	Analysis_HID_3130	
	Analysis_HID_310_50rfu	
	Analysis_HID_3130_50rfu	
Setări diagramă	PlotsBT5_4dyes	
Setări tabel	Tabel pentru 2 alele	
	Tabel pentru 10 alele	

Panелеle și BinSets trebuie utilizate întotdeauna, în timp ce restul fișierelor matrice sunt opționale.

Matrici Biotype® adiționale pentru software-ul GeneMapper® ID-X:

Stutter* Chimera_Stutter_v1X sau versiuni mai noi

* Când se încarcă panелеle mai sus menționate, setările stutter nu vor fi acceptate. De aceea, datele stutter trebuie importate separat.

Matricile Biotype® recomandate pentru software-ul Genotyper sunt:

Mentype_Chimera_v1 Sau versiuni mai noi

Notă importantă: Importul și apelarea alelelor cu fișierele matrice furnizate sunt garantate doar la utilizarea software-ului GeneMapper® ID/ID-X. Când se aplică software-ul GeneMapper®, pot să apară probleme de import la unele fișiere matrice. E posibil să fie necesară ajustarea Panелеlor și Bin-urilor cu una sau mai multe rulări ale scalei alelice, în setările instrumentului dvs. Contactați-ne pentru suport (support@biotype.de).

Procedura generală pentru analiză

1. Verificare standard ADN de mărime
2. Verificare scală alelică
3. Verificare control pozitiv
4. Verificare control negativ
5. Analiză și interpretare a datelor probei

4.2 Controale

ADN-ul de control XY5, care face parte din kitul de testare și alte ADN-uri din linii de celule standard disponibile pe piață reprezintă următoarele alele:

Tabelul 9. Repartiția alelelor la Mentype® Chimera®

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

Pentru confirmare suplimentară, tabelul de mai sus prezintă alelele ADN-ului de referință achiziționat de la ATCC, cât și trei repartiții de ADN de referință achiziționat de la Coriell Cell Repositories, după standardul lui Szibor *et al.* (2003).

4.3 Lungimea fragmentelor și alelelor

Tabelele 10-12 prezintă lungimile de fragmente ale alelelor individuale ale Standardului ADN de mărime 550 (BTO). Toate analizele au fost efectuate într-un analizor genetic ABI PRISM® 310/3130, cu polimer POP-4®. Instrumente diferite de analiză, standarde diferite de lungime a ADN-ului și polimeri diferiți pot da lungimi de fragmente diferite. În plus, se recomandă alinierea vizuală cu scala alelică.

Scalare

Orizontal: 70-480 bp

Vertical: În funcție de intensitatea semnalului

Figura 2

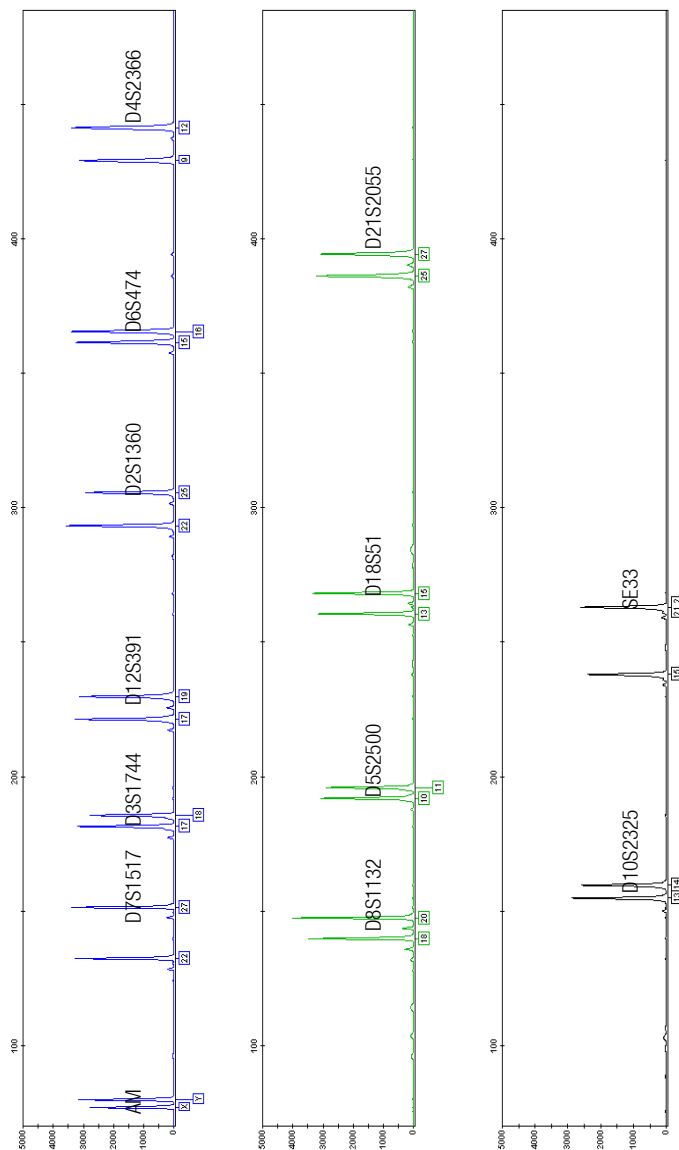


Fig. 2 Electroferograma Mentype® Chimera® la utilizarea a 500 pg ADN de control XY5. Analiza a fost efectuată într-un analizor genetic ABI PRISM® 3130, cu Standard ADN de mărime 550 (BTO). Repartiția alelelor a fost efectuată utilizându-se software-ul GeneMapper® ID și fișierul matrice Mentype® Chimera®.

Figura 3

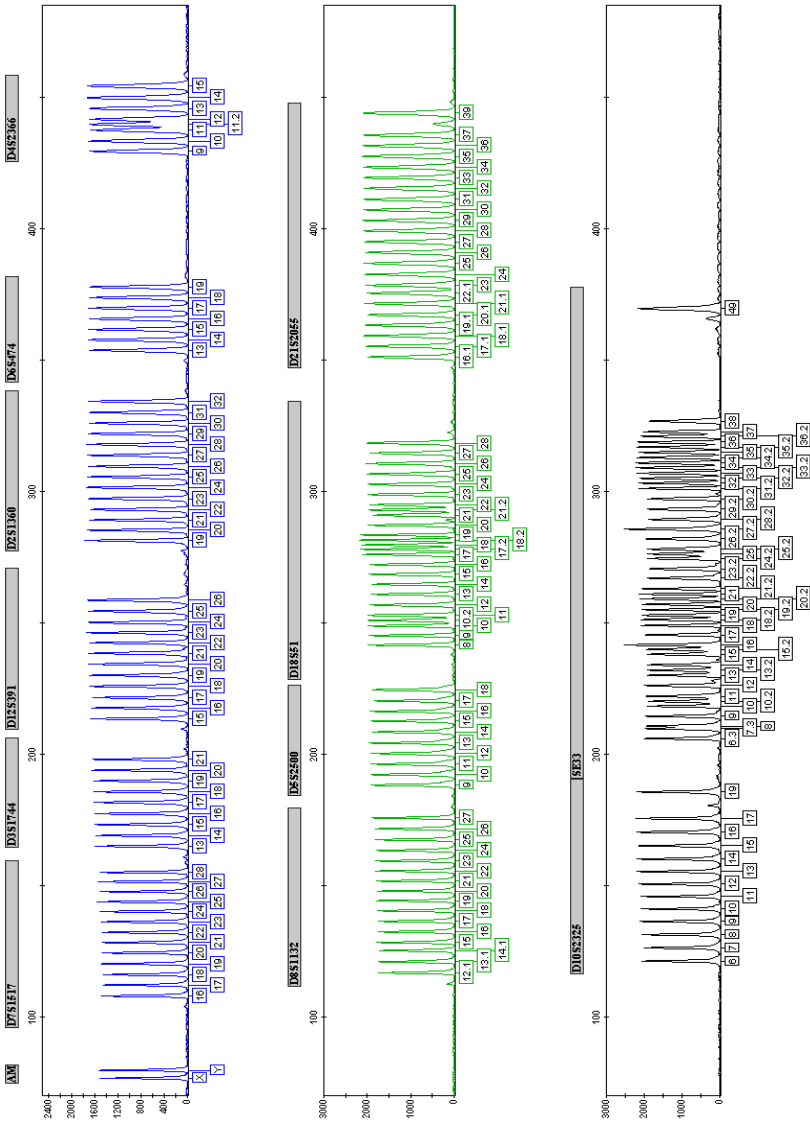


Fig. 3 Electroferograma scalei alelice Mentye® Chimera®. Analiza a fost efectuată într-un analizor genetic ABI PRISM® 3130, cu Standard ADN de mărime 550 (BTO). Repartiția alelelor a fost efectuată utilizându-se software-ul GeneMapper® ID și fișierul matrice Mentye® Chimera®.

Tabelul 10. Lungimi de fragmente ale scalei alelice Mentype® Chimera® analizate într-un analizor genetic ABI PRISM® 3130 cu polimer POP-4®. (panelul albastru)

Marker/ alelă	Dimen siune [bp]*	Alele suplimen tare**	Marker/ alelă	Dimen siune [bp]*	Alele suplimen tare**	Marker/ alelă	Dimen siune [bp]*	Alele suplimen tare**
Amelog enină	6-FAM		D12S39 1	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	
D7S151 7	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		D4S236 6	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		D2S136 0	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				
D3S174 4	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				

Tabelul 11. Lungimi de fragmente ale scalei alelice Mentype® **Chimera**® analizate într-un analizor genetic ABI PRISM® 3130 cu polimer POP-4®. (panelul verde)

Marker/alelă	Dimensiune [bp]*	Alele suplimentare**	Marker/alelă	Dimensiune [bp]*	Alele suplimentare**	Marker/alelă	Dimensiune [bp]*	Alele suplimentare**
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							

Tabelul 12. Lungimi de fragmente ale scalei alelice Mentype® Chimera® analizate într-un analizor genetic ABI PRISM® 3130 cu polimer POP-4®. (panelul galben)

Marker/alelă	Dimensiune [bp]*	Alele suplimentare**	Marker/alelă	Dimensiune [bp]*	Alele suplimentare**	Marker/alelă	Dimensiune [bp]*	Alele suplimentare**
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				

* rotunjit la unitate

** Alelele din bazinul de ADN al Biotype aflate „în afara scalei” sunt repartizate prin fișierele matrice Biotype® pentru software-ul GeneMapper® ID sau Genotyper. Pentru alele suplimentare, vizitați http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm

† pentru o mai bună orientare, aceste alele sunt înălțate pe scala alelică.

5. Interpretarea rezultatelor

Cum s-a menționat anterior, analiza post-PCR și repartiția automată a alelelor cu un software de analiză potrivit asigură diferențierea precisă și de încredere a alelelor.

Calculul automat al raportului de ADN donator/receptor, cât și deviațiile standard și limitele de detecție pot fi obținute direct din datele brute ale analizei lungimii unui fragment.

Dacă rezultatele obținute cu Mentype® **Chimera**® sunt armonizate cu rezultatele analizelor citologice, asigurați-vă că analizele citologice au fost efectuate pe cel puțin 500 leucocite.

Peak-uri „de tragere”

Peak-urile „de tragere” pot să apară dacă înălțimile peak-urilor sunt în afara limitei de detecție liniară sau dacă s-a aplicat o matrice incorectă. Ele apar pe pozițiile peak-urilor specifice de pe alte canale de culori, de obicei cu intensități de semnal mai joase.

Peak-uri stutter

Apariția peak-urilor stutter depinde de secvența structurii de repetiție și de numărul de alele. Peak-urile n-4 sunt provocate de pierderea unei unități de repetiție în timpul amplificării motivelor STR tetranucleotide, prin efecte de alunecare a Taq ADN polimerazei. Interpretarea acestor peak-uri trebuie făcută în conformitate cu fișierele matrice ale software-urilor Genotyper și GeneMapper® ID/ID-X.

Adiția de nucleotide independentă de matrice

Din cauza activității transferazei sale terminale, Multi Taq ADN polimeraza are tendința de a adăuga un radical adenzină la capătul 3' al fragmentelor de ADN amplificate. Peak-ul artefact este mai scurt cu o bază decât cel așteptat (peak-uri -1 bp). Toți primerii Biotype® sunt concepuți să minimizeze aceste artefacte. Formarea de artefacte este redusă suplimentar prin pasul final de extensie al protocolului PCR la 68 °C timp de 60 min. Înălțimea peak-ului artefact se corelează cu cantitatea de ADN. Laboratoarele trebuie să-și definească limite individuale pentru analiza peak-urilor.

Artefacte

Temperatura ambientală poate influența randamentul produșilor de PCR la utilizarea de instrumente multicapilare; pot să apară peak-uri „umăr” sau peak-uri clivate. Mai mult, în unele cazuri poate fi influențată repartiția automată. Dacă apar aceste efecte, se recomandă injectarea din nou a probei la o temperatură ambientală mai mare și eventual folosirea mai multor probe de scală alelică per ciclu de funcționare.

Influența polimerilor

Kitul Mentype® **Chimera**® a fost validat și certificat pentru analiza cu polimer POP-4. Utilizarea altor polimeri (de ex. POP-7™ sau POP-6™) poate influența comportamentul anumitor produși de PCR. Mai mult, zgomotul de fundal poate crește din cauza comportamentului diferit al coloranților fluorescenți liberi.

6. Date de genetică a populației

Cele mai importante date de genetică a populației ale markerilor STR sunt listate în tablele 13-16. Formula de calcul a Conținutului de Informații privind Polimorfismul (PIC) a fost publicată de Botstein *et al.* (1980), Heterozigizitatea Așteptată (HET) de către Nei și Roychoudhury *et al.* (1974), iar Puterea de Discriminare (PD) de către Jones *et al.* (1972). Toate formulele sunt potrivite pentru markeri autozomiali.

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

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

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

Tabelul 13. Date de genetică a populației

Marker D2S1360		Marker D3S1744		Marker D4S2366	
Alelă	Frecvența alelei	Alelă	Frecvența alelei	Alelă	Frecvența alelei
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				

Tabelul 14. Date de genetică a populației

Marker D5S2500		Marker D6S474		Marker D7S1517	
Alelă	Frecvența alelei	Alelă	Frecvența alelei	Alelă	Frecvența alelei
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

Tabelul 15. Date de genetică a populației

Marker D8S1132		Marker D10S2325		Marker D12S391	
Alelă	Frecvența alelei	Alelă	Frecvența alelei	Alelă	Frecvența alelei
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

Tabelul 16. Date de genetică a populației

Marker D18S51		Marker D21S2055		Marker SE33 (ACTBP2)	
Alelă	Frecvența alelei	Alelă	Frecvența alelei	Alelă	Frecvența alelei
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

Toate datele de genetică a populației se bazează pe analiza efectuată de Biotype GmbH pe circa 210 europeni neînruđiți.

7. Referințe

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.

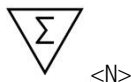
8. Explicarea simbolurilor



Producător



Număr de lot



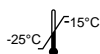
Conține suficienți reactivi pentru <N> teste



A se vedea instrucțiunile electronice de utilizare



A se utiliza până la data de



Limitele temperaturii de păstrare



Număr de catalog



Diagnostic In-Vitro-



A se feri de lumină



A se păstra ferit de umezeală

Specificații: Kit de amplificare PCR Mentype® Chimera®

A Validare analitică

A a) Determinarea reacției standard și a toleranței cu specificitate de lot

Obiectiv: Determinarea reacției standard și a toleranțelor cu specificitate de lot ale PCR-ului multiplex, și a nivelului de bază pentru înălțimile relative de semnal (RFU) și pentru echilibrul înălțimilor de semnal.

Metodologie: Kitul de testare conține ADN de control, care este heterozigot în majoritatea sistemelor STR. Reacția standard a fost efectuată în determinări cvadruple, cu ADN de control în concentrație nominală de 500 pg. S-au aplicat suplimentar patru valori blank (fără matrice de control, NTC) fără ADN.

Rezultate: Pentru amestecurile de primeri PCR cu specificitate de lot s-au stabilit următoarele specificații: înălțimi de semnal de 1 000-4 000 RFU la utilizarea analizorului genetic ABI PRISM® 310 și înălțimi de semnal de 1 000-5 000 RFU la utilizarea analizorului genetic ABI PRISM® 3130. Fluctuațiile înălțimilor de semnal în sistemele heterozigote nu trebuie să depășească 30 % din valoarea indicată de notele de ghidare.

În intervalul de scalare nu s-au observat semnale nespecifice ≥ 50 RFU (nivelul de bază) pentru valorile blank.

A b) Acuratețea genotipării

Obiectiv: Acuratețea repartiției alelelor este dovedită statistic în condiții standard. Testul verifică apelarea automată a alelelor pe scala alelică și concordanța repartiției alelelor comparativ cu pre-tiparea ADN-urilor de testat prin intermediul altor metode (alte kituri PCR, secvențiere directă etc), utilizând software-ul GeneMapper ID. Pe baza rezultatelor, se definesc setările test-specifice ale dispozitivului pentru genotiparea prin intermediul electroforezei capilare în gel (bin-uri și paneele), și proporția de peak-uri stutter pentru analiza matricilor secvențiatorului de ADN.

Metode: S-au testat 80 de ADN-uri umane pre-tipate, din diferite surse (sânge, frotiu de obraz), în determinări unice. În plus, s-a efectuat un blank (fără ADN). Criteriile de acceptare au fost definite ca profiluri complete cu înălțimi de peak ≥ 50 RFU (evaluare manuală).

Rezultate: După determinarea setărilor test-specifice ale dispozitivului, s-a repartizat genotipul corect tuturor probelor de ADN pentru toate sistemele STR și markerul amelogenină.

A c) Specificitatea analitică

Obiectiv: Scopul studiului este de a exclude rezultatele fals pozitive, consecință a reactivității încrucișate cu probe selecționate de ADN non-uman. Totuși, în practica clinică ADN-ul non-uman poate fi în mare măsură exclus, ca urmare a prelevării sterile.

Metodă: S-au testat 2,5 ng ADN genomic de *Bos Taurus* (bovine), *Sus scrofa domestica* (porc), *Canis lupus familiaris* (câine), *Felis catus* (pisică) și *Oryctolagus cuniculus* (iepure domestic). Acest ADN animal provenea din probe de sânge furnizate ca material rezidual din studii veterinare.

Rezultate: Nu s-a detectat reactivitate încrucișată pe zona de alele (< 200 RFU).

A d) Sensibilitatea analitică

Obiectiv: Determinarea limitei de detecție analitică (sensibilitatea).

Metodă: S-au testat în cvadruplicat o serie de diluții între 500 pg și 31,5 pg de ADN de referință. Criteriul de acceptare a fost definit ca profiluri complete de ADN cu ≥ 200 RFU.

Rezultate: S-a determinat o limită de detecție de 200 pg ADN genomic.

A e) Performanța de testare cu diferiți termociclatori PCR

Obiectiv: Termociclatorii PCR de la diferiți producători diferă la nivel de specificații. Se pot observa în special rate diferite de încălzire și răcire, precum și diferite tehnici de control al temperaturii.

Metodă: S-a efectuat testarea reacțiilor standard cu ADN de control în concentrație nominală de 500 pg, cu câte 4 determinări, folosindu-se același amestec master și 2 probe blank (fără ADN), cu următorii termociclatori: *GeneAmp 9700* cu Alu-block (Life Technologies, Division Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt), *GeneAmp 9700* cu 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) și *Eppendorf Mastercycler ep-S* (Eppendorf AG, Hamburg).

Rezultate: Nu s-au detectat produși secundari nespecifici ≥ 200 RFU. Deviația mediei înălțimilor de peak comparativ cu reacția standard a fost de 20 % la o pantă definită de 2 °C/sec.

A f) Probe de ADN mixt

Obiectiv: Scopul analizei himerismului după transplant alogen de celule stem îl reprezintă detecția și cuantificarea relativă a fracțiunilor de ADN ale donatorului și receptorului. Pentru a detecta boala reziduală minimă, se vor detecta cele mai mici cantități posibile de ADN de la donator sau receptor dintr-o probă mixtă.

Metodă: S-au preparat trei amestecuri independente din două ADN-uri, ADN-ul deficient reprezentând 0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 30 % și 50 %. ADN-urile din amestecuri prezentau cel puțin trei loci STR informativi cu patru alele informative. În fiecare caz, 1 ng din amestecurile de ADN a fost testat în patru amestecuri paralele, în modul de reacție standard. S-au evaluat înălțimi de semnal de cel puțin 50 RFU.

Rezultate: Rezultatele sunt prezentate în Figura 4. Pentru ADN-ul deficient, s-a atins limita de detecție de 1 %. Aceasta corespunde cu valorile 1-5 % obținute cu kiturile STR convenționale utilizate în analiza himerismului.

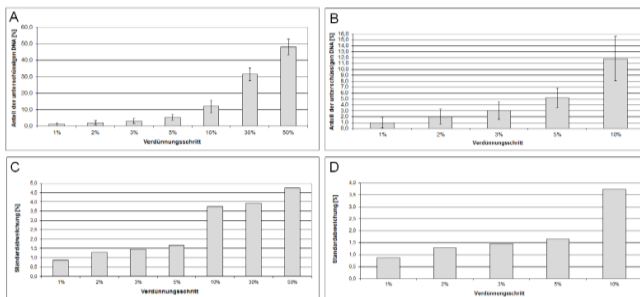


Fig. 4: Testarea amestecurilor de ADN (A, B). Valorile medii și deviația standard ale fracțiunilor de ADN deficient, calculate din înălțimile de semnal ale electroforezei capilare (C, D) deviația standard pentru A și B

A g) Temperaturi de aliniere PCR

Obiectiv: Pentru a determina robustețea metodei PCR, se simulează fluctuații ale temperaturii de aliniere a primerului în cadrul PCR-ului multiplex. Temperatura acestui pas este critică pentru sensibilitatea și specificitatea procesului PCR.

Metodă: S-a variat temperatura de aliniere kit-specifică de $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ și $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, în condiții standard de reacție, cu ADN de control în concentrație nominală de 500 pg. S-a efectuat o triplă determinare cu aceeași soluție master mix.

Rezultate: Nu s-au detectat produși secundari nespecifici ≥ 200 RFU la $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Înălțimea medie a peak-urilor la $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ a deviat de la reacția standard cu maximum $\pm 30\%$. Nu s-au detectat erori de semnal alelic < 200 RFU la $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A h) Fluctuații ale loturilor de tampon PCR

Obiectiv: Raportul între concentrațiile componentelor din tamponul PCR „Amestec A de reacție” (dNTP, concentrația ionilor, în special Mg^{2+}) este critic pentru sensibilitatea, specificitatea și echilibrul semnalelor în PCR-ul multiplex. De aceea, robustețea testului este determinată în funcție de fluctuațiile loturilor de tampon PCR.

Metode: S-au testat trei loturi independente de Amestec A de reacție, în condiții standard de reacție, cu ADN de control în concentrație nominală de 500 pg.

Rezultate: Nu s-au detectat produși secundari nespecifici ≥ 50 RFU. Deviația înălțimii medii a peak-urilor comparativ cu reacția standard a fost de maximum 20 %.

A i) Inhibitori de PCR

Obiectiv: Hematina din hemoglobină este un inhibitor potent al ADN Taq polimerazei dacă nu este îndepărtată complet în timpul purificării ADN-ului provenit din sânge total stabilizat.

Metodă: S-a testat efectul hematinei porcine (Sigma-Aldrich, Freiburg) în concentrație finală de 0-250 μM în condiții standard de reacție, cu ADN de control în concentrație nominală de 500 pg.

Rezultate: S-au obținut profiluri complete (≥ 50 RFU) până la o concentrație inhibitorie a hematinei porcine de 100 μM . Pentru concentrația finală de 150 μM nu s-au mai obținut profiluri complete (doar profiluri parțiale).

A j) Stabilitatea la utilizare

Obiectiv: Stabilitatea reactivilor din kitul PCR a fost testată după înghețări și dezghețări repetate.

Metodologie: Reactivii din kit au fost supuși la un ciclu de 20 înghețări-dezghețări. Înghețarea a avut loc timp de cel puțin 1 h la -20 °C.

Amestecul a fost dezghețat la temperatura camerei și reactivii au fost omogenizați prin agitare înainte de utilizare. Ulterior, s-a efectuat o reacție standard cu ADN de control în concentrație nominală de 500 pg și valori blank fără ADN, cu determinări în triplicat. Evaluarea s-a făcut în comparație cu o reacție standard efectuată fără parcurgerea ciclului îngheț-dezgheț.

Rezultate: Deviația înălțimii medii a peak-urilor comparativ cu reacția standard a fost de maximum 20 % (în special pierderi de semnal). Nu s-au găsit peak-uri suplimentare > 50 RFU în intervalul de scalare, pentru valorile blank.

B Date de eficiență clinică**B a) Designul de studiu, aspecte de etică și legislație**

S-a efectuat un studiu clinic de performanță conform articolelor 20-24 din Legea germană privind dispozitivele medicale. Protocolul a fost aprobat de către autoritatea națională competentă BfArM conform articolului 7 din Ordonanța germană privind testarea clinică a dispozitivelor medicale și de către comitetul instituțional de etică. Toți participanții și-au dat acordul informat în scris.

B b) Metode de referință

Diferențierea citogenetică a leucocitelor donatorului și receptorului prin intermediul hibridizării fluorescențe in situ (FISH) a servit ca test comparativ. S-a utilizat kitul cu specificitate pentru cromozomul de sex CE-IVD CEP® X SpectrumOrange™ / Y SpectrumGreen™ Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden), conform instrucțiunilor producătorului.

B c) Extracția și purificarea ADN-ului

Extracția ADN-ului din probele heparinizate de sânge complet a fost efectuată cu kitul QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden), conform indicațiilor producătorului.

B d) Rezultate

S-au colectat în total 103 seturi de date de la pacienți adulți, în diferite zile după transplantul alogen de celule stem din sânge sau transplantul de măduvă osoasă. Perechile donator-receptor au fost de genuri diferite genetic și astfel au fost potrivite pentru hibridizarea FISH, care are specificitate pentru cromozomul de sex. S-a utilizat cel puțin 1,5 ng ADN genomic per PCR. Întâi s-au determinat toate sistemele STR informative ale perechilor donator-receptor și s-a confirmat sexul prin genotiparea markerului amelogenină, parte a PCR-ului multiplex. Pentru rezultatele de PCR s-au utilizat valorile medii ale înălțimilor de semnal ale tuturor sistemelor STR informative (cel puțin 2). Rezultatele analizei de concordanță sunt rezumate în Fig.5.

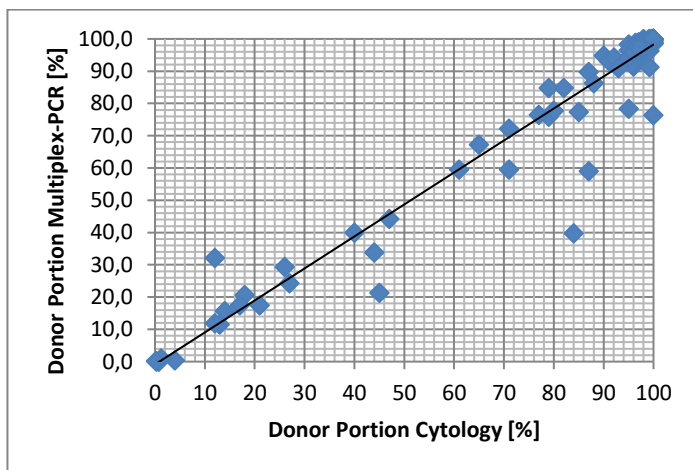


Fig. 5: Analiza concordanței PCR-ului multiplex comparativ cu citologia.

În cazul a 92 dintre cele 103 seturi de date (90,3 %), deviația rezultatelor între PCR-ul multiplex și citologie a fost mai mică de 5 %. Deviații mai mari s-au observat doar la datele citologice în care numărul total de celule analizate a fost 500 sau mai mic. Conform recomandărilor producătorului kitului FISH, trebuie analizate cel puțin 200 celule. Totuși, conform recomandărilor din practică, numerele absolute mai mari (500-1 000 de celule) produc rezultate citogenetice mai bune [1, 2].

B e) Referințe

- 1) **Thiede C.** Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. (*Analiza cu rol diagnostic a himerismului după transplant alogen de celule stem: noi metode și markeri.*) 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. (*Doza de celule CD34+, regimul de condiționare și chimioterapia prealabilă: factori cu impact semnificativ asupra cineticii timpurii a himerismului donatorului după transplantul alogen de celule hematopoietice*) Bone Marrow Transplant 2004; 34: 949-54.

Biotype GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 Dresda

Tel. +49 351 8838 400

Fax +49 351 8838 403

info@biotype.de

www.biotype.de