

Mentype[®] Chimera[®]

Istruzioni per l'uso

Il nuovo standard nell'analisi del chimerismo

Prodotto medico per diagnostica in vitro



CHNIFU01v3it
Maggio 2021



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



Lotto



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

Made in Germany

Biotype GmbH sviluppa, produce e commercializza applicazioni basate su PCR per la medicina diagnostica.

I nostri kit per test Mentype® garantiscono il più alto standard di qualità per la clinica e la ricerca.

Siamo a vostra disposizione per informazioni e suggerimenti. Contattateci o visitate la nostra homepage www.biotype.de

Mentype[®] Chimera[®]

Descrizione del prodotto

Mentype[®] **Chimera**[®] è un'applicazione per PCR multiplex per l'analisi del chimerismo a seguito di trapianto di midollo osseo o di cellule staminali ematopoietiche.

Mentype[®] **Chimera**[®] è stato convalidato mediante l'analisi del chimerismo in oltre 200 coppie donatore/ ricevente HLA-compatibili. Inoltre, l'idoneità del test è stata verificata e confermata nell'ambito di una valutazione clinica dell'efficacia. Il kit è usato con successo nella routine clinico-diagnostica.

I marcatori genetici del Mentype[®] **Chimera**[®] sono distribuiti in oltre 12 cromosomi e rappresentano microsatelliti ad alto polimorfismo (STR) con un alto tasso di eterozigosi e una distribuzione equilibrata di alleli. Queste caratteristiche aumentano le possibilità di identificare loci informativi per la differenziazione donatore/ricevente e offrono quindi una maggiore sicurezza e robustezza nell'analisi del chimerismo.

Grazie a Mentype[®] **Chimera**[®] è possibile amplificare i 12 loci autosomici ad alto polimorfismo **D2S1360, D3S1744, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517, D8S1132, D10S2325, D12S391, D18S51, D21S2055, SE33 (ACTBP2)** e il locus specifico del sesso dell'**Amelogenina** simultaneamente in un'unica reazione di PCR. I primer sono marcati con le sostanze coloranti fluorescenti **6-FAM, BTG o BTY**.

Il limite di rivelabilità del kit Mentype[®] **Chimera**[®] è di **200 pg di DNA genomico**. In condizioni standard, l'intervallo ottimale corrisponde a **0,2-1,0 ng di DNA**.

Il test è stato validato per l'uso su dispositivi GeneAmp[®] 9700 Aluminium Thermocycler, Eppendorf Mastercycler ep-S, Biometra, ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer con POP-4[®] e ABI PRISM[®] 3130 Genetic Analyzer con POP-4[®].

Indice

1. Descrizione del Mentype® Chimera®	5
2. Amplificazione PCR	8
2.1 Composizione del master mix	8
2.2 Parametri di amplificazione PCR.....	9
3. Elettroforesi capillare su gel	11
3.1 Preparazione dei prodotti per PCR.....	11
3.2 Analisi della lunghezza dei frammenti	11
4. Valutazione	13
4.1 Modelli di valutazione Biotype®	14
4.2 Controlli.....	15
4.3 Lunghezze dei frammenti e alleli	15
5. Interpretazione dei risultati	22
6. Dati della popolazione genetica	23
7. Bibliografia	26
8. Spiegazione dei simboli	27
Specifiche del kit di amplificazione PCR Mentype® Chimera®	28
A Convalida analitica	28
A a) Determinazione della reazione standard e delle tolleranze specifiche del lotto 28	
A b) Test della precisione di genotipizzazione	28
A c) Test della specificità analitica.....	29
A d) Test della sensibilità analitica.....	29
A e) Test di diversi termociclatori per PCR	29
A f) Test di diversi campioni compositi di DNA.....	30
A g) Test dell'influenza di diverse temperature di annealing nella PCR	30
A h) Test di diversi lotti di buffer per PCR.....	31
A i) Test degli inibitori della PCR	31
A j) Conservabilità dopo l'apertura.....	31
B Dati di efficacia clinica	32
B a) Prelievo dei campioni: aspetti etici e normativi	32
B b) Test di comparazione	32
B c) Estrazione e purificazione del DNA	32
B d) Risultati	32
B e) Bibliografia	33

1. Descrizione del Mentype® Chimera®

Tabella 1. Informazioni specifiche del locus per il Mentype® Chimera®

Locus	GenBank® Accession	Motivo di ripetizione dell'allele di riferimento	Allele di riferime nto	Regione allelica
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

La Tabella 1 mostra i loci STR con i motivi di ripetizione e gli alleli. La nomenclatura corrisponde alle linee guida della "International Society for Forensic Genetics, (ISFG) (Bär et al., 1997). Per i loci STR D8S1132 e D12S391 si adotta la nomenclatura di Hering e Müller (2001), per i loci D4S2366 e D6S474 quella di Becker *et al.* (2007), per il locus D10S2325 quella di Wiegand *et al.* (1999) e per il locus D7S1517 la nomenclatura di Wiegand e Klintschar (2002). La regione allelica indicata tiene conto degli alleli riconosciuti dal National Institute of Standards and Technology (NIST, versione 12/2008) e della letteratura corrente.

Tabella 2. Mappatura cromosomica per il Mentype® Chimera®

Locus	Mappatura cromosomica
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

Indice

Mentype® Chimera®

Didascalia	Contenuto	25 reazioni	Volume 100 reazioni	400 reazioni
Nuclease-Free water	Acqua priva di nucleasi	1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Miscela di reazione A	125 µL	500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® Chimera® Primer Mix	Miscela primer	63 µL	250 µL	4 x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase N*	Multi Taq 2 DNA polimerasi N*	10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® Chimera® Control DNA XY5	DNA di controllo XY5 (2 ng/µl) o DNA di controllo XY1726 (2 ng/µl)	10 µL	10 µL	10 µL
Mentype® Chimera® Control DNA XY1726	Standard di lunghezza del DNA 550 (BTO)	13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® Chimera® Allelic Ladder	Scala allelica	25 µL	25 µL	4 x 25 µL

* Dal kit con numero di lotto **LEUK01093** in poi, i kit contengono il nuovo Polymerase N.

Attenzione: non mischiare i componenti di diversi kit. Una panoramica dei numeri di lotto è indicata sull'etichetta situata all'interno dell'aletta della scatola. Non è consentita un'aliquotazione dei componenti del kit in altri contenitori per reazioni.

Informazioni per l'ordine

Nota: la confezione in formato 1000 delle reazioni non è più in vendita.

Mentype® Chimera®	25	reazioni	Cod. ordine	45-13210-0025
Mentype® Chimera®	100	reazioni	Cod. ordine	45-13210-0100
Mentype® Chimera®	400	reazioni	Cod. ordine	45-13210-0400

Conservazione

La conservazione avviene a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C. Evitare lo scongelamento e il congelamento ripetuti. La miscela del primer e la scala allelica devono essere conservate al riparo dalla luce. Il DNA di controllo e i reagenti post-PCR (scala allelica e standard di lunghezza del DNA) devono essere conservati separatamente dagli altri reagenti di PCR. La data di scadenza del kit per i test è indicata sull'etichetta della confezione.

Reagenti aggiuntivi

Per l'amplificazione PCR e la preparazione dei campioni sono necessari, oltre agli elementi del kit, i seguenti reagenti:

Tabella 3. Altri reagenti necessari per il funzionamento del Mentype® Chimera®

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

Avvertenze e indicazioni per la sicurezza

Consultare la scheda tecnica di sicurezza.

Le schede tecniche di sicurezza degli elementi del kit sono disponibili su richiesta. Rivolgersi ai rispettivi produttori per le schede tecniche di sicurezza dei reagenti che non sono contenuti nel kit.

A lotto LEUK01073 (Reaction Mix A lotto CH1901224)

In questo kit sono contenute le seguenti sostanze potenzialmente pericolose:

Elemento del kit	Sostanza chimica	Pericolo
Reaction Mix A	Azoturo di sodio NaN ₃	Tossico se ingerito, forma gas velenosi in caso di contatto con acidi

Assicurazione di qualità

Il contenuto completo del kit è sottoposto ad approfonditi controlli di qualità da parte della Biotype GmbH. La qualità del kit è costantemente controllata per offrire un'utilizzabilità senza limitazioni. Vi preghiamo di contattarci per qualsiasi domanda sull'assicurazione di qualità.

Marchi e brevetti

Mentype® e **Chimera**® sono marchi registrati della Biotype GmbH. ABI PRISM® e GeneScan® sono marchi registrati in Germania della Applied Biosystems LLC, GeneMapper®, GeneAmp® e Applied Biosystems® sono marchi registrati della Applied Biosystems LLC.

POP-4® è un marchio registrato in Europa della Applied Biosystems LLC.

La PCR è protetta da brevetto. I titolari del brevetto sono le aziende Roche Molecular Systems e F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Protocollo per l'amplificazione PCR, l'elettroforesi e l'analisi

2. Amplificazione PCR

2.1 Composizione del master mix

La seguente tabella mostra i volumi degli elementi del kit impiegati per un volume di campioni di 1,0 μL (DNA template) in un volume di reazione di 25 μL . Tenere conto del numero di reazioni di PCR da utilizzare per il controllo positivo e negativo. Aggiungere una o due reazioni al numero totale per compensare gli errori di pipettaggio.

Tabella 4. Composizione del master mix per Mentype® Chimera®

Componenti	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 (hot start, 2,5 U/ μL) • Polymerase N	0,4 μL
Quantità totale di master mix	24,0 μL

* Contiene Mg^{2+} , dNTP, BSA

Tutti i reagenti devono essere mescolati (con il vortex) e brevemente centrifugati (circa 10 s) prima della composizione del master mix.

La quantità del DNA impiegato è calcolata in base alla sua concentrazione. Per il campione di comparazione è generalmente sufficiente 1 μL . Per i campioni di pazienti critici è possibile aumentare relativamente la quantità di template. Il volume dell'acqua priva di nucleasi deve essere corretto in modo che il volume totale del composto per PCR sia sempre di 25 μL .

I campioni di DNA devono essere conservati in acqua priva di nucleasi o in un tampone diluito di TE (10 mM Tris HCl, pH 8,0 e 1 mM EDTA), per es. 0,1 x TE tampone.

La miscela di primer è regolata in modo che **in 30 cicli di PCR con 0,5 ng di DNA di controllo XY5 o XY1726** in un volume di reazione di 25 μL siano raggiunti picchi di altezza equilibrata. Se si utilizza più template di DNA, si possono verificare picchi molto alti nei frammenti di PCR piccoli e picchi proporzionalmente più bassi nei frammenti di PCR più grandi. Ridurre la quantità di DNA per correggere questo squilibrio.

Controllo positivo

Nota: Dal kit con numero di lotto **LEUK01071** in poi, i kit contengono il nuovo DNA di controllo positivo **XY1726**, il quale si differenzia dal DNA di controllo XY5 precedente in merito al profilo genetico. La concentrazione e la relativa procedura sperimentale sono rimaste invariate. È possibile utilizzare il numero di lotto del kit e l'indice (che si trova sull'etichetta della confezione del kit) per determinare quale DNA di controllo è incluso nel kit. Il nuovo profilo genetico e gli alleli da rilevare si trovano nella Figura 2B e nella Tabella 9.

Per il controllo positivo diluire il DNA di controllo XY5 o XY1726 a 0,5 ng/ μL nel volume corrispondente. Pipettare il DNA di controllo diluito al posto del template di DNA nel recipiente di reazione con il master mix PCR presente.

Controllo negativo

Come controllo negativo pipettare l'acqua priva di nucleasi, al posto del template di DNA, nel recipiente di reazione con il PCR master mix presente.

Template di DNA

Il valore di misurazione della concentrazione di DNA può variare secondo il metodo di quantificazione utilizzato, perciò la quantità ottimale di DNA deve essere eventualmente adattata.

2.2 Parametri di amplificazione PCR

Per attivare la multi Taq 2 DNA polimerasi e sopprimere la formazione di prodotti aspecifici di amplificazione è assolutamente necessario eseguire un "hot start".

Il numero di cicli dipende dalla quantità di DNA. Si consigliano 30 cicli di PCR per tutti i campioni. Per il materiale critico (< 100 pg DNA) si raccomandano fino a 32 cicli per un'intensità di segnale ottimale.

Metodo standard

Raccomandato per tutti i campioni di DNA.

Tabella 5. Protocollo standard di amplificazione PCR

Temperatura	Ora	
94 °C	4 min	(hot start per l'attivazione della multi Taq2 DNA polimerasi)
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	30 cicli
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	fino alla fine

Opzionale

Raccomandato per piccole quantità di DNA

Tabella 6. Protocollo di amplificazione PCR opzionale in caso di ridotte quantità di DNA

Temperatura	Ora	
94 °C	4 min	(hot start per l'attivazione della multi Taq 2 DNA polimerasi)
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	32 cicli
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	fino alla fine

Osservazione: per un equilibrio ottimale del kit con dispositivi PCR con tassi di riscaldamento e raffreddamento veloci (> 2 °C/s) si consiglia di impostare il ramping su 2 °C/s.

A causa di una quantità insufficiente di DNA si può giungere a errori statistici (allelic dropout) e altezze del picco non equilibrate. Inoltre, aumenta la possibilità di prodotti di amplificazione aspecifici. Aumentando il numero di cicli possono inoltre verificarsi contaminazioni incrociate dovute a quantità minime di DNA estraneo.

3. Elettroforesi capillare su gel

3.1 Preparazione dei prodotti per PCR

Al termine della PCR rimuovere i campioni dal termociclatore e centrifugarli brevemente. Scongelare i reagenti formamide Hi-Di™ (non contenuto nel kit) e DNA Size Standard 550 (BTO), mescolare brevemente le provette e centrifugarle brevemente. Preparare il composto descritto nella Tabella 7 con formamide Hi-Di™ e il DNA Size Standard 550 (BTO), quindi aggiungere al composto una o due reazioni per compensare gli errori di pipettaggio.

Tabella 7. Composto della miscela di denaturazione

Componenti	Volumi per reazione
Formamide Hi-Di™	12,0 µL
Size Standard 550 (BTO)	0,5 µL

Pipettare 12 µL della miscela di denaturazione con formamide e DNA Size Standard 550 (BTO) nel numero corrispondente di pozzetti di una piastra per PCR (idonea per l'uso nel Genetic Analyzer). Quindi aggiungere 1 µL di prodotto PCR o 1 µL di scala allelica del Mentype® **Chimera**® in ogni pozzetto. Chiudere la piastra per PCR con una pellicola adatta, miscelare nel vortex e centrifugare brevemente. Rimuovere la pellicola e chiudere la piastra con il setto del produttore del dispositivo.

Nota: la scala allelica è usata per determinare correttamente i frammenti analizzati durante l'analisi dei dati. In ogni ciclo di analisi della lunghezza dei frammenti la scala allelica deve essere analizzata almeno una volta per assicurare il successo dell'analisi dei dati.

Nota: i capillari del dispositivo per elettroforesi su gel non devono funzionare a secco. Se i campioni non occupano tutte le posizioni dei capillari, riempire gli altri pozzetti della piastra con 12 µL di formamide Hi-Di™ secondo il numero di capillari.

Denaturare i prodotti per PCR preparati su un termociclatore per PCR per 3 minuti a 95 °C, quindi raffreddare i campioni nel termociclatore fino a 4 °C. Centrifugare brevemente i campioni prima dell'analisi della lunghezza dei frammenti.

3.2 Analisi della lunghezza dei frammenti

Le istruzioni generali per il dispositivo di analisi, la creazione della matrice e l'uso del software GeneMapper™ sono reperibili nel relativo manuale di istruzioni *ABI PRISM® Genetic Analyzer User's Manual*.

Dopo avere eseguito con successo la calibrazione spettrale del dispositivo per elettroforesi capillare su gel con il reagente Matrix Standard BT5 (Biotype GmbH), creare uno specifico modulo di corsa (ABI 310, ABI 3130) o un protocollo strumentale (ABI 3500) con i seguenti parametri:

Tabella 8. Parametri di corsa specifici per l'analisi della lunghezza dei frammenti del Mentype® Chimera®

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

Diversamente dai valori riportati nella Tabella 8, il tempo di corsa può essere adattato per analizzare tutti i frammenti (60-550 bp) del DNA Size Standard 550 (BTO).

Nota: seguire le istruzioni del produttore del dispositivo di elettroforesi capillare su gel per impostare gli specifici parametri di corsa.

Nota: osservare anche le ulteriori informazioni per la calibrazione e uso dei prodotti Mentype® sui dispositivi di elettroforesi capillare su gel, disponibili su richiesta tramite support@biotype.de da Biotype GmbH.

4. Valutazione

Le istruzioni generali per la valutazione automatica sono reperibili nei rispettivi manuali di istruzioni dei software *GeneMapper® ID/ID-X Software User's Manual*.

Osservazione: nell'interpretazione del Mentype® **Chimera**® è necessario nascondere il pannello rosso.

La determinazione della lunghezza esatta dei frammenti dei prodotti amplificati dipende dal tipo di dispositivo, dalle condizioni dell'elettroforesi e dallo standard di lunghezza del DNA utilizzato. A causa della complessità di alcuni loci STR si deve utilizzare il maggior numero possibile di punti di riferimento distribuiti uniformemente ai fini della determinazione delle lunghezze. A tale scopo utilizzare il DNA standard di lunghezza 550 (BTO) con frammenti di lunghezza **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**.

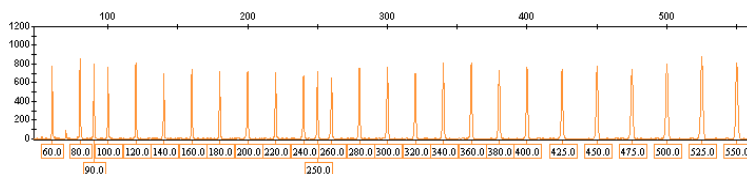


Fig. 1 Elettroferogramma dello standard di lunghezza del DNA 550 (BTO), lunghezze dei frammenti in bp

Osservazione: per la valutazione e l'analisi del Mentype® **Chimera**® con il software *GeneMapper® ID/ID-X* può essere utilizzato il modello di valutazione dello standard di lunghezza del DNA SST-BTO_60-500 bp.

4.1 Modelli di valutazione Biotype®

L'assegnazione degli alleli di tutti i prodotti di PCR separati (genotipizzazione) può avvenire con l'aiuto di un software adatto per la valutazione, per es. con il software GeneMapper® ID/ID-X in combinazione con Mentype® Chimera® e i relativi modelli di valutazione Biotype®. I modelli di valutazione Biotype® (Template Files) sono disponibili sulla nostra homepage (www.biotype.de) per il download. Su richiesta potremo inviare anche un CD-ROM.

I modelli Biotype® consigliati per il software GeneMapper® ID/ID-X sono:

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

#A causa del nuovo controllo positivo, il pannello e il set di contenitori **v2** devono essere utilizzati per la valutazione dei dati a partire dal kit con numero di lotto **LEUK01071**.

I pannelli e BinSets devono essere sempre usati, mentre gli altri modelli di valutazione sono opzionali.

Altri modelli Biotype® consigliati per il software GeneMapper® ID-X sono:

Stutter* Chimera_Stutter_v1X# o versione superiore

* Durante il caricamento dei pannelli succitati, le regolazioni Stutter non sono accettate e il file dello stutter deve essere importato a parte.

Nota importante: l'importazione dell'assegnazione degli alleli con i modelli per la valutazione presentati può essere garantita solamente per il software GeneMapper® ID/ID-X: se si utilizza GeneMapper® possono presentarsi problemi durante l'importazione di alcuni modelli di valutazione. In questo caso, i pannelli e i Bin devono essere adattati a uno o più cicli della scala allelica per l'adeguamento alla specifica configurazione del dispositivo. Contattare il nostro supporto per ottenere assistenza (support@biotype.de).

Metodi di procedimento generali per la valutazione

1. Controllo dello standard di lunghezza (size standard)
2. Controllo della scala allelica (allelic ladder)
3. Controllo del controllo positivo
4. Controllo del controllo negativo
5. Valutazione dei dati del campione

4.2 Controlli

Il DNA di controllo XY5 a LEUK01070 o DNA di controllo XY1726 da LEUK01071 contenuto nel Mentype® **Chimera**® così come i DNA disponibili sul mercato rappresentano i seguenti alleli:

Tabella 9. Assegnazione degli alleli con il Mentype® **Chimera**®

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

Nella tabella sono mostrati gli alleli per il DNA di riferimento che sono disponibili presso ATCC, in particolare presso Coriell Cell Repositories. In tal modo si soddisfano i requisiti di Szibor et al. (2003).

4.3 Lunghezze dei frammenti e alleli

I valori riportati nelle Tabelle da 10 a 12 per la lunghezza dei frammenti di ogni singolo allele si riferiscono al DNA standard di lunghezza 550 (BTO) e alla misurazione sull'ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer con polimero POP-4®. In caso di utilizzo di dispositivi di analisi diversi, il DNA standard di lunghezza o i polimeri possono comportare una divergenza della lunghezza dei frammenti.

A causa di differenze specifiche del dispositivo si consiglia una regolazione individuale del dispositivo utilizzato (fine tuning) secondo la misura della lunghezza dei frammenti. Inoltre, deve essere eseguito un confronto visivo con la scala allelica.

Graduazione

Orizzontale: 70-480 bp

Verticale: secondo l'intensità di segnale del campione

Figura 2A

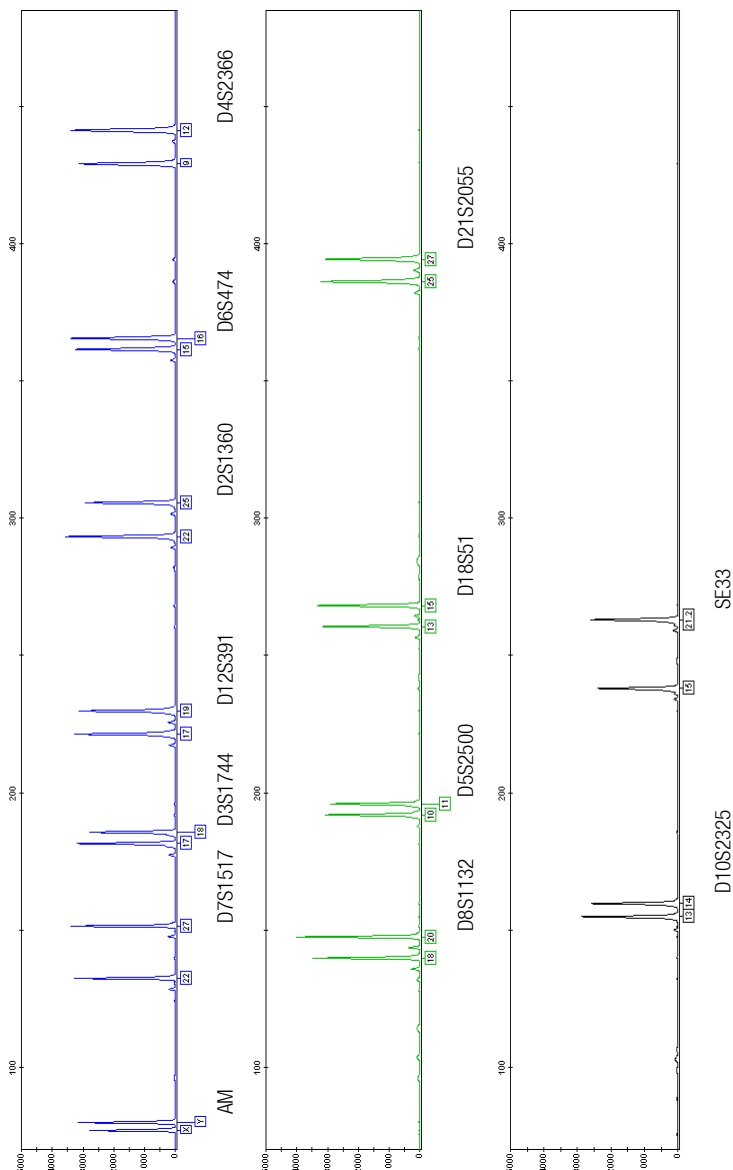


Fig. 2 Elettroferogramma del Mentype® **Chimera**® con l'utilizzo di 500 pg di **(A)** DNA di controllo XY5 o **(B)** DNA di controllo XY1726. L'analisi è stata eseguita su un ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer con DNA standard di lunghezza 550 (BTO). L'assegnazione degli alleli è stata eseguita con il software GeneMapper® ID e il Template File Mentype® **Chimera**®.

Figura 2B

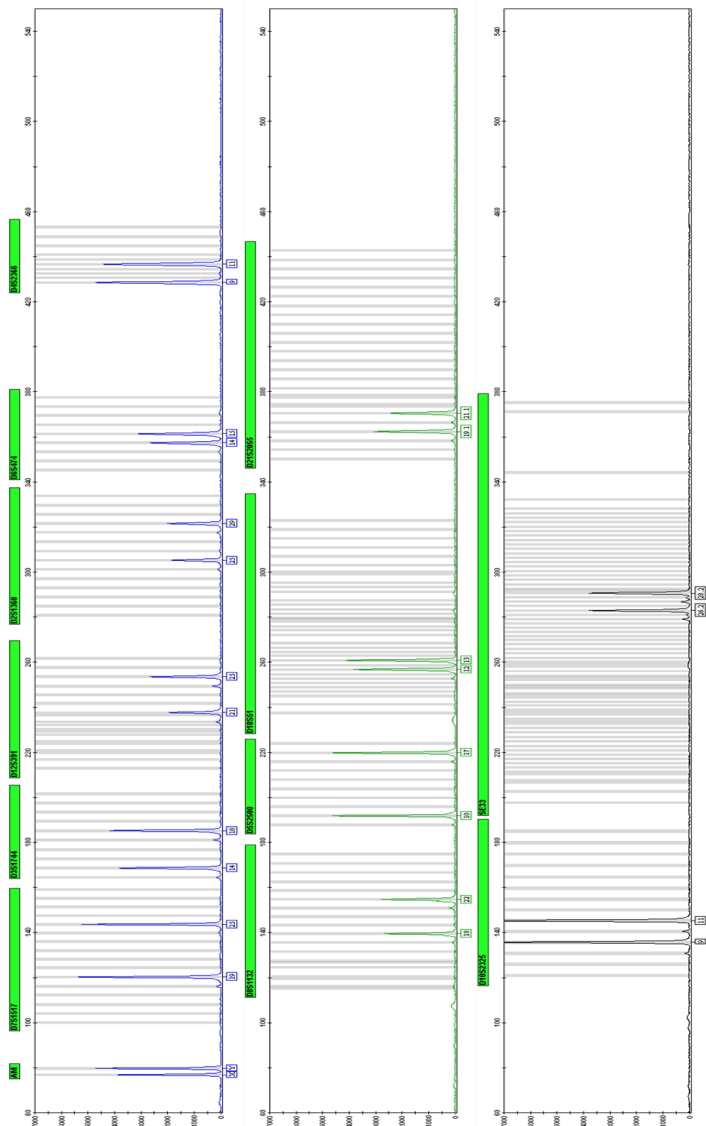


Figura 3

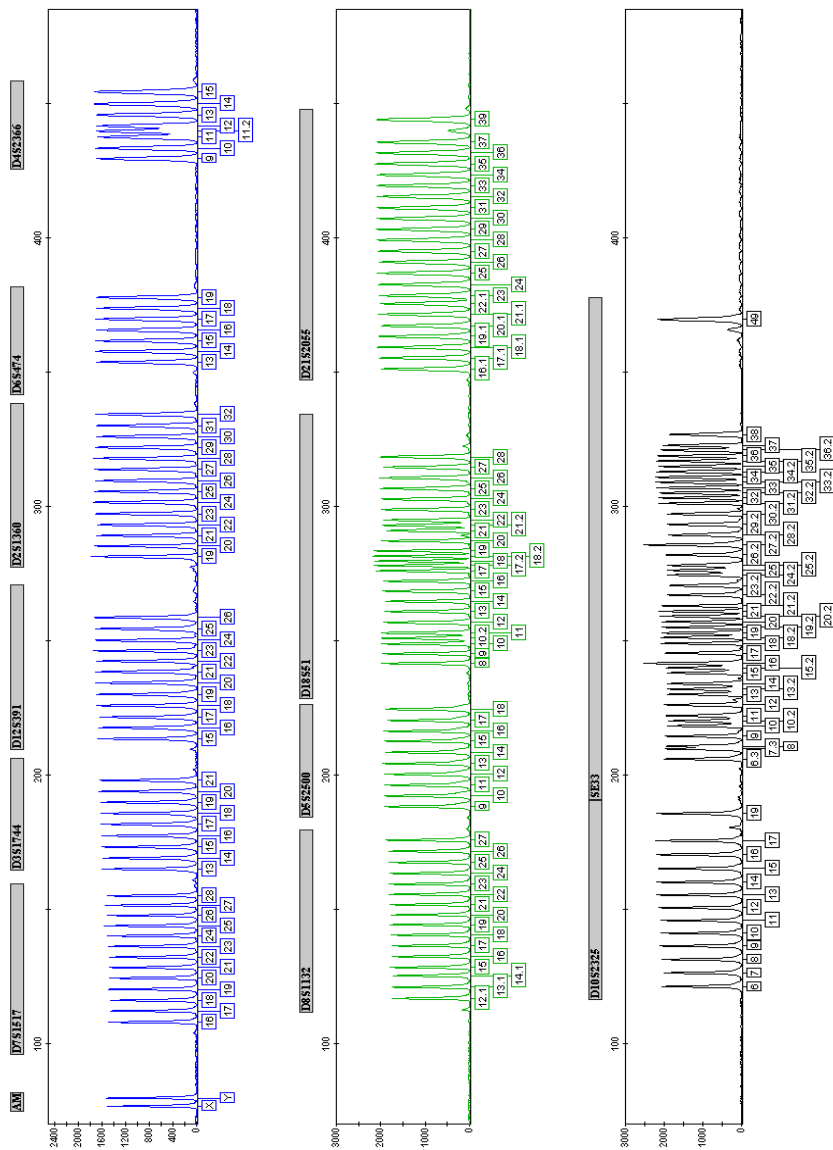


Fig. 3 Elettroferogramma della scala degli alleli Menteype® Chimera® analizzato su ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer. L'assegnazione degli alleli è stata eseguita con il software GeneMapper® ID e il Template File Menteype® Chimera®.

Tabella 10. Lunghezze dei frammenti della scala allelica Mentype® **Chimera**® misurata con l'ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer con polimero POP-4® (pannello blu)

Marcatore/ Allele	Dimension i [bp]*	Altri alleli**	Marcatore/ Allele	Dimension i [bp]*	Altri alleli**	Marcatore/ Allele	Dimension i [bp]*	Altri alleli**
Amelogenin a	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				

Tabella 11. Lunghezze dei frammenti della scala allelica Mentype® Chimera® misurata con ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer con polimero POP-4® (pannello verde)

Marcatore / Allele	Dimensioni [bp]*	Altri alleli**	Marcatore/ Allele	Dimensioni [bp]*	Altri alleli**	Marcatore / Allele	Dimensioni [bp]*	Altri alleli**
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							

Tabella 12. Lunghezze dei frammenti della scala allelica Mentype® **Chimera**® misurata con l'ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer con polimero POP-4® (pannello giallo)

Marcatore/ Allele	Dimensioni i [bp]*	Altri alleli**	Marcatore / Allele	Dimensioni i [bp]*	Altri alleli**	Marcatore / Allele	Dimensioni i [bp]*	Altri alleli**
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				

* Arrotondato ai numeri interi

** Questi alleli "off-ladder" del Biotype DNA Pools sono stati assegnati con i Template File Biotype® correnti per il software GeneMapper® ID/ID-X. Per ulteriori alleli v. anche il sito http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm

‡ Questi alleli sono stati evidenziati per un orientamento migliore all'interno della scala allelica.

5. Interpretazione dei risultati

La valutazione descritta in precedenza con l'assegnazione automatica degli alleli garantisce una distinzione esatta e affidabile degli alleli.

Un calcolo automatico della percentuale di DNA del donatore può essere eseguito direttamente in base ai dati grezzi di un'analisi dei frammenti.

Per poter comparare i risultati ottenuti con il Mentype® **Chimera**® con i risultati delle analisi citologiche (analisi Fish) si devono utilizzare almeno 500 leucociti durante l'analisi citologica.

Artefatti (picchi pull-up)

Se si utilizza una matrice non adatta per l'analisi oppure se le altezze dei picchi si trovano al di fuori dell'intervallo di rilevamento lineare del dispositivo, possono verificarsi artefatti tra i pannelli colorati. Gli artefatti sono riconoscibili in quanto compaiono nella stessa posizione di picchi specifici, ma in pannelli colorati diversi (generalmente con minore intensità di segnale).

Picchi stutter (stutter peak)

Il verificarsi di picchi stutter dipende dalla sequenza e dal numero delle unità di ripetizione. Nel caso dei motivi tetranucleotidici STR si verificano a causa degli errori della Taq DNA polimerasi durante i picchi PCR n-4, cioè il picco stutter è più piccolo di 4 basi dell'allele autentico. Le unità di ripetizione si spostano velocemente all'interno del STR. Per la valutazione dei picchi, seguire i modelli dei Template File del software GeneMapper™ ID/ID-X.

Adesione di nucleotidi indipendente dal template

La Taq DNA polimerasi, a causa dell'attività della sua terminal transferasi, predilige un'adenosina, e dipende dall'estremità 3' del frammento di DNA amplificato. Se il sistema PCR non ha a disposizione abbastanza tempo per l'estensione, oppure se la sequenza del primer non è favorevole all'estensione, questa adesione non ha luogo. Questo artefatto è riconoscibile dalla presenza di una base di frammenti più corti (picco -1 bp). Tutti i primer Biotype® sono elaborati in modo da ridurre al minimo la formazione di questi artefatti. Inoltre, questa formazione di artefatti è ridotta grazie alla fase di estensione finale nel protocollo PCR (68 °C per 60 min.). L'altezza del picco di questo artefatto aumenta in caso di alte quantità di DNA. Per valutare il picco, ogni laboratorio deve stabilire un proprio valore limite.

Artefatti

La temperatura ambiente può influenzare fortemente la corsa dei prodotti per PCR sui dispositivi a capillari e una temperatura insufficiente può causare l'insorgenza di spalle o picchi doppi (split peak). Inoltre, l'assegnazione automatica degli alleli può risultare compromessa. Qualora si osservino questi effetti, consigliamo un'altra iniezione dei campioni eventualmente anche con diverse scale alleliche per ciclo.

Influenza del tipo di polimero

Mentype® **Chimera**® è stato convalidato e certificato su POP-4®. L'utilizzo di un altro polimero (per es. POP-7 o POP-6) può modificare l'andamento del ciclo e la forma dei picchi di specifici prodotti per PCR. Inoltre, è stato osservato un maggiore rumore di sottofondo dovuto a una modifica nel comportamento dei residui liberi di coloranti fluorescenti.

6. Dati della popolazione genetica

I dati della più importante popolazione genetica per ogni marcatore STR sono riportati nelle tabelle 13-16. La formula per il calcolo del **Polymorphism Information Content** (PIC) è stata pubblicata da Botstein et al. (1980) ed era stata pubblicata in precedenza per la **Expected Heterozygosity** (HET) di Nei e Roychoudhury et al. (1974) e per la formula del calcolo della **Power of Discrimination** (PD) di Jones et al. (1972). Tutte le formule sono adatte per i marcatori autosomici.

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

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

$$PD = 1 - \sum_j f_j^2$$

Tabella 13. Dati della popolazione genetica

Marcatore D2S1360		Marcatore D3S1744		Marcatore D4S2366	
Allele	Frequenza allelica	Allele	Frequenza allelica	Allele	Frequenza allelica
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				

Tabella 14. Dati della popolazione genetica

Marcatore D5S2500		Marcatore D6S474		Marcatore D7S1517	
Allele	Frequenza allelica	Allele	Frequenza allelica	Allele	Frequenza allelica
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

Tabella 15. Dati della popolazione genetica

Marcatore D8S1132		Marcatore D10S2325		Marcatore D12S391	
Allele	Frequenza allelica	Allele	Frequenza allelica	Allele	Frequenza allelica
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

Tabella 16. Dati della popolazione genetica

Marcatore D18S51		Marcatore D21S2055		Marcatore SE33 (ACTBP2)	
Allele	Frequenza allelica	Allele	Frequenza allelica	Allele	Frequenza allelica
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

Tutti i dati della popolazione genetica si basano su uno studio eseguito dalla Biotype GmbH su circa 210 caucasici non imparentati.

7. Bibliografia

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. Spiegazione dei simboli



Produttore



Lotto



Sufficiente per <N> test



Riferimento alle istruzioni per l'uso in formato elettronico



Utilizzabile fino a



Limitazione di temperatura



Numero di ordinazione



Prodotto medico per diagnostica in vitro



Proteggere dalla luce



Tenere in un luogo asciutto

Specifiche del kit di amplificazione PCR Mentype® Chimera®

A Convalida analitica

A a) Determinazione della reazione standard e delle tolleranze specifiche del lotto

Obiettivo: determinazione della reazione standard e delle tolleranze specifiche del lotto in riferimento all'altezza relativa dei segnali (RFU), all'equilibrio delle altezze dei segnali della PCR multiplex e della linea base.

Metodica: il kit per test è accompagnato da un DNA di controllo eterozigote nella maggior parte dei sistemi STR. La reazione standard è avvenuta con il DNA di controllo alla concentrazione nominale di 500 pg in quadruplica determinazione. Sono stati eseguiti anche quattro bianchi (no template control, NTC) senza DNA.

Risultati: per la miscelazione degli specifici lotti del primer per PCR sono state determinate le seguenti specifiche: utilizzando un *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer* sono state ottenute altezze di segnale di 1 000-4 000 RFU e utilizzando un *ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer* sono state determinate altezza di segnale di 1 000-5 000 RFU. Le oscillazioni per le altezze dei segnali di sistemi eterozigoti possono ammontare a un massimo del 30 % del valore di riferimento. Nell'intervallo di graduazione non è stato determinato alcun segnale aspecifico a ≥ 50 RFU (linea base).

A b) Test della precisione di genotipizzazione

Obiettivo: la precisione dell'assegnazione degli alleli è garantita statisticamente nelle condizioni standard. Il test controlla l'*allele calling* automatico con la scala allelica e la concordanza dell'assegnazione degli alleli rispetto al pretipizzazione del DNA di controllo con altri metodi (altri kit per PCR, sequenziazione diretta, ecc.) mediante il software GeneMapper ID. In base ai risultati sono state determinate le impostazioni del dispositivo per lo specifico test di genotipizzazione mediante elettroforesi capillare su gel (bin e pannelli) e la percentuale di picchi stutter per i modelli di valutazione del sequenziatore di DNA.

Metodica: sono stati esaminati, in test singolo, 80 campioni di DNA pretipizzato di donatori umani volontari di origine diversa (sangue intero, tamponi orali). Inoltre, è stato eseguito un bianco senza DNA. Come criterio di accettazione sono stati definiti i profili completi con altezze di picco ≥ 50 RFU (valutazione manuale).

Risultati: tutti i campioni di DNA hanno potuto essere assegnati al genotipo corretto grazie alla determinazione delle impostazioni del dispositivo per lo specifico test di tutti i sistemi STR e al marcatore dell'amelogenina.

A c) Test della specificità analitica

Obiettivo: l'analisi ha lo scopo di escludere i falsi positivi dovuti alla reattività crociata con campioni di DNA non umano selezionati. Nella pratica clinica è tuttavia possibile escludere ampiamente qualsiasi DNA non umano grazie al prelievo sterile dei campioni.

Metodica: sono stati testati 2,5 ng di DNA genomico di *Bos taurus* (manzo), *Sus scrofa* domestica (maiale domestico), *Canis lupus familiaris* (cane), *Felis catus* (gatto) e *Oryctolagus cuniculus* (coniglio domestico). I DNA animali provenivano da campioni di sangue che erano stati messi a disposizione come residui di esami veterinari.

Risultati: nella regione degli alleli non è stata rinvenuta alcuna reattività crociata (< 200 RFU).

A d) Test della sensibilità analitica

Obiettivo: l'analisi aveva lo scopo di stabilire il limite di rivelabilità analitica (sensibilità).

Metodica: è stata testata una serie di diluizioni contenenti da 500 pg a 31,5 pg di DNA di riferimento in quadruplica determinazione. Come criterio di accettazione sono stati definiti profili completi di DNA con ≥ 200 RFU.

Risultati: è stato determinato un limite di rivelabilità di 200 pg di DNA genomico.

A e) Test di diversi termociclatori per PCR

Obiettivo: i termociclatori per PCR di produttori diversi differiscono tra loro per quanto riguarda le specifiche. In particolare possono essere presenti diverse velocità di riscaldamento e raffreddamento così come diverse tecniche di regolazione della temperatura.

Metodica: il test delle reazioni standard con DNA di controllo alla concentrazione nominale di 500 pg è stato eseguito in quadruplica determinazione con i seguenti termociclatori, usando la stessa miscela master e 2 bianchi senza DNA: Thermocycler *GeneAmp 9700* con blocco in alluminio (Life Technologies, Division Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt) insieme ai dispositivi *GeneAmp 9700* con blocco in argento (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).

Risultati: non è stato rilevato alcun prodotto secondario ≥ 200 RFU. La differenza tra le altezze dei picchi determinate rispetto alla reazione standard era pari a un ramping definito di 2 °C/s a un massimo del 20 %.

A f) Test di diversi campioni composti di DNA

Obiettivo: l'obiettivo dell'analisi del chimerismo a seguito di trapianto allogenico di cellule staminali ematiche è l'accertamento e la quantificazione relativa delle percentuali di DNA di donatore e ricevente. Per l'accertamento della minima malattia residua si devono rilevare le minime quantità possibili di DNA di donatore o ricevente in una miscela di campioni.

Metodica: sono state prodotte 3 miscele indipendenti con due DNA, nelle quali il DNA minoritario era aggiunto in percentuali variabili da 0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 %. I DNA delle miscele hanno mostrato almeno 3 loci STR con quattro alleli informativi. 1 ng di ciascuna miscela di DNA è stato testato nella reazione standard in quattro ripetizioni parallele. Sono state analizzate altezze di segnale di almeno 50 RFU.

Risultati: i risultati sono illustrati nella Figura 4. Per il DNA minoritario è stato possibile raggiungere un limite di rivelabilità dell'1 %, corrispondente ai valori di 1-5 % ottenuti con i kit STR forensici nell'analisi del chimerismo.

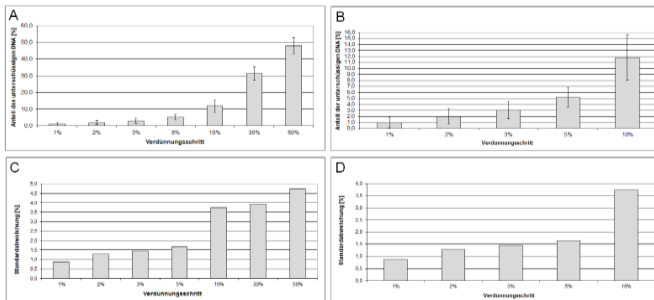


Fig. 4: Test delle miscele di DNA. (A, B) valori medi e deviazione standard delle percentuali di DNA minoritario calcolato in base alle altezze di segnale dell'elettroforesi capillare su gel. (C, D) Deviazioni standard da A e B.

A g) Test dell'influenza di diverse temperature di annealing nella PCR

Obiettivo: per la determinazione della robustezza della PCR sono state simulate oscillazioni di temperatura nella fase di legame del primer (annealing) della PCR multiplex. Questa fase termica è critica per la sensibilità e la specificità della PCR.

Metodica: la temperatura di annealing di 60 °C, specifica del kit della reazione standard con il DNA di controllo alla concentrazione nominale di 500 pg è stata alterata di ± 1 °C e ± 2 °C. Quindi è stata eseguita una triplice determinazione con la stessa miscela master.

Risultati: con ± 1 °C non è stato rilevato alcun prodotto secondario aspecifico ≥ 200 RFU. Con ± 1 °C divergevano per un massimo del ± 30 % rispetto alla

reazione standard. Con ± 2 °C non è stata rilevata alcuna caduta del segnale allelico < 200 RFU.

A h) Test di diversi lotti di buffer per PCR

Obiettivi: i rapporti delle concentrazioni dei componenti del buffer della miscela A della PCR (dNTP, concentrazioni di ioni, specialmente Mg^{2+}) sono decisivi per la sensibilità, la specificità e l'equilibrio dei segnali nella PCR multiplex. Pertanto è stata analizzata la robustezza del test rispetto alle oscillazioni dei lotti del tampone PCR fornito.

Metodica: il test di 3 lotti indipendenti della miscela di reazione A è avvenuto nella reazione standard con il DNA di controllo alla concentrazione nominale di 500 pg.

Risultati: non è stato rilevato alcun prodotto secondario ≥ 50 RFU. La differenza delle altezze dei picchi, rispetto alla reazione standard era pari al 20 %.

A i) Test degli inibitori della PCR

Obiettivo: l'ematina dell'emoglobina è un potente inibitore della *Taq* DNA polimerasi e non può essere completamente eliminata in caso di insufficiente depurazione del DNA da sangue intero stabilizzato.

Metodica: l'effetto della *Hematin porcine* (Sigma-Aldrich, Friburgo) è stato testato in concentrazioni finali di 0-250 μ M nella reazione standard con DNA di controllo alla concentrazione nominale di 500 pg.

Risultati: profili completi (≥ 50 RFU) sono stati ottenuti in presenza di una concentrazione finale inibitrice di 100 μ M di *Hematin porcine*. A partire da una concentrazione di 150 μ M non è stato possibile ottenere alcun profilo completo (profili parziali).

A j) Conservabilità dopo l'apertura

Obiettivo: la stabilità dei reagenti del kit per PCR è stata testata dopo ripetuti congelamenti e scongelamenti.

Metodica: i reagenti del kit sono stati sottoposti a 20 cicli di congelamento e scongelamento. Il congelamento è stato eseguito per 1 h a -20 °C. Lo scongelamento è avvenuto a temperatura ambiente e i reagenti sono stati omogeneizzati prima dell'uso. Infine, è stata effettuata una reazione standard, in triplice determinazione, con il DNA di controllo alla concentrazione nominale di 500 pg e altri bianchi senza DNA. La valutazione ha preso come riferimento una reazione standard senza congelamento e scongelamento.

Risultati: la differenza delle altezze dei picchi, rispetto alla reazione standard, era pari al 20 % (specialmente la perdita di segnale). Nei bianchi non è stato registrato alcun altro picco > 50 RFU entro l'intervallo di graduazione.

B Dati di efficacia clinica**B a) Prelievo dei campioni: aspetti etici e normativi**

È stato eseguito uno studio della valutazione di efficacia secondo gli articoli da 20 a 24 della legge tedesca sui prodotti medicinali. L'esenzione dell'obbligo di autorizzazione per i prodotti medicinali con basso rischio per la sicurezza secondo l'articolo 7 dell'ordinanza sugli esami clinici dei prodotti medicinali è stata concessa dall'Istituto federale tedesco per i farmaci e i prodotti medicinali. Sono presenti il voto unanime della commissione etica competente e le dichiarazioni di consenso informato dei pazienti.

È stato utilizzato sangue venoso intero eparinizzato.

B b) Test di comparazione

Come test di comparazione è stata eseguita una differenziazione citogenetica tra i leucociti del donatore e del ricevente mediante ibridazione a fluorescenza in situ (FISH). È stato usato il CE-IVD CEP[®] X SpectrumOrange™/ Y SpectrumGreen™ Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, DE) specifico per i cromosomi sessuali, secondo le istruzioni del produttore.

B c) Estrazione e purificazione del DNA

L'estrazione del DNA dal sangue intero eparinizzato è stata effettuata con il QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE), secondo le istruzioni del produttore.

B d) Risultati

In totale sono stati raccolti 103 set di dati di misura da pazienti adulti, in giorni diversi, dopo un trapianto allogenico di midollo osseo o di cellule staminali ematiche. Le coppie di donatori e riceventi differivano geneticamente per il sesso ed erano perciò idonee al FISH specifico per i cromosomi sessuali. Sono stati usati almeno 1,5 ng di DNA genomico per ogni PCR. Innanzitutto sono stati determinati tutti i sistemi informativi STR delle coppie donatore/ricevente, confermandone il sesso per mezzo della genotipizzazione del marcatore dell'amelogenina, che fa parte della PCR multiplex. Per il referto della PCR sono stati impiegati i valori medi delle altezze dei segnali di tutti i sistemi informativi STR (almeno 2). I risultati dei test di comparazione sono raccolti nella Fig. 5.

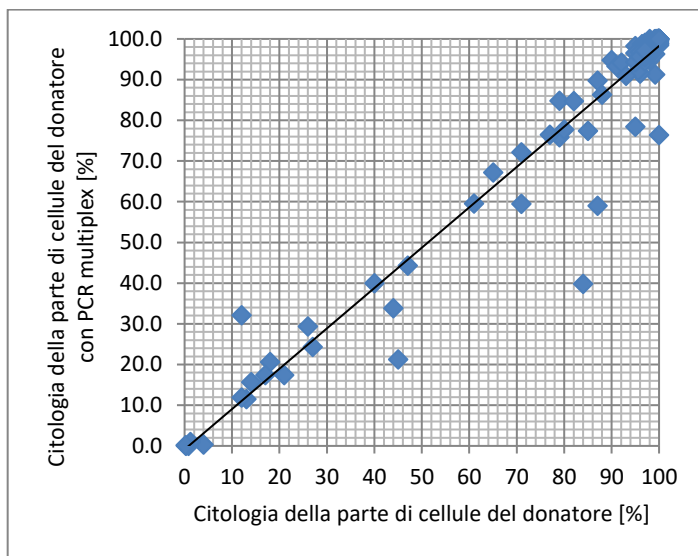


Fig. 5: Analisi della concordanza della PCR multiplex rispetto alla citologia.

In 92 dei 103 set di dati (90,3 %), la deviazione dei referti della PCR multiplex rispetto alla citogenetica era inferiore al 5 %. Deviazioni maggiori sono state osservate esclusivamente nel caso di referti citogenetici nei quali il numero totale di cellule conteggiate era minore o uguale a 500. Secondo le raccomandazioni del produttore del kit FISH, il conteggio avrebbe dovuto dare un risultato di almeno 200 cellule. Secondo le raccomandazioni pratiche, tuttavia, conteggi cellulari ancora più alti (500-1 000) forniscono migliori risultati citogenetici [1, 2].

B e) Bibliografia

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

Biotype GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 Dresden

Tel. +49 351 8838 400

Fax +49 351 8838 403

info@biotype.de

www.biotype.de