

# Mentype<sup>®</sup> DIPquant

## Istruzioni per l'uso

**L'applicazione qPCR specifica per la quantificazione dello stato del chimerismo allelico**

Prodotto medico per diagnostica in vitro



DIQIFU01v1it  
Luglio 2020



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



Biotype GmbH  
Moritzburger Weg 67  
D-01109 Dresden  
Germany

xx\* - Definisce il codice articolo specifico per il locus

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 massimo standard di qualità.

Siamo a vostra disposizione per informazioni e suggerimenti. Contattateci o visitate la nostra homepage [www.biotype.de](http://www.biotype.de).

## Indice

<b>1. Utilizzo conforme</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Informazioni base</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Descrizione del prodotto Mentype® DIPquant</b> .....	<b>5</b>
3.1 Strumento qPCR .....	6
3.2 Tipo di campione .....	6
3.3 Sensibilità/Specificità .....	6
<b>3.3.1 Intervallo di misura del chimerismo</b> .....	<b>6</b>
<b>3.3.2 Sensibilità e specificità</b> .....	<b>6</b>
<b>4. Avvertenze e indicazioni per la sicurezza</b> .....	<b>8</b>
4.1 Assicurazione di qualità.....	8
<b>5. Materiali forniti</b> .....	<b>9</b>
5.1 Contenuto del kit .....	9
5.2 Informazioni per l'ordine.....	9
5.3 Reagenti e dispositivi richiesti e non inclusi nel kit .....	10
<b>6. Conservazione</b> .....	<b>11</b>
<b>7. Procedura di lavoro</b> .....	<b>11</b>
7.1 Panoramica dell'analisi del chimerismo con i prodotti Mentype® DIP .....	11
7.2 Preparazione dei campioni e volume d'impiego del DNA.....	12
<b>7.2.1 Estrazione del DNA</b> .....	<b>12</b>
<b>7.2.2 Utilizzo del DNA stampo</b> .....	<b>12</b>
7.3 Composizione della miscela master .....	12
<b>7.3.1 Controllo positivo</b> .....	<b>13</b>
<b>7.3.2 Controllo negativo</b> .....	<b>13</b>
7.4 Volume di reazione .....	14
<b>8. Programma e amplificazione qPCR</b> .....	<b>14</b>
8.1 Impostazioni del dispositivo e parametri di amplificazione.....	14
8.2 Parametri di rilevazione.....	14
8.3 Parametri di amplificazione qPCR* .....	15
<b>9. Setup consigliato per l'analisi</b> .....	<b>15</b>
9.1 Quantificazione prima del trapianto (pre-HSCT).....	16
9.2 Quantificazione dopo il trapianto / monitoraggio (post-HSCT) .....	16
<b>10. Valutazione</b> .....	<b>18</b>
10.1 Analisi dei dati.....	18
10.2 Controllo dei risultati .....	18
<b>11. Quantificazione</b> .....	<b>19</b>
11.1 Quantificazione dei campioni pre-HSCT.....	19
11.2 Quantificazione dei campioni post-HSCT .....	19
<b>12. Interpretazione di risultati insoliti</b> .....	<b>20</b>
12.1 Bassa intensità o assenza di segnale .....	20

12.2 Oscillazioni dell'intensità del segnale all'interno dei replicati .....	20
12.3 Segnali di test specifici del ricevente nel DNA del donatore .....	21
<b>13. Informazioni per l'ordine.....</b>	<b>22</b>
<b>14. Bibliografia.....</b>	<b>24</b>
<b>15. Marchi ed esclusione di responsabilità.....</b>	<b>25</b>
<b>16. Simboli .....</b>	<b>26</b>
<b>Verifica e validazione dei kit di amplificazione qPCR Mentype® DIPquant .....</b>	<b>27</b>
<b>A Dati analitici dell'efficacia (verifica) .....</b>	<b>27</b>
A a) DNA umano .....	27
A b) Specificità analitica e Limit of Blank (LoB) .....	27
A c) Sensibilità analitica e Limit of Detection (LoD).....	27
A d) Intervallo di misura dei test .....	28
A e) Oscillazioni dei lotti e prestazioni del test di LoD .....	28
A f) Misurazione in due giorni diversi.....	29
A g) Conservabilità dopo l'apertura .....	30
<b>B Dati di efficacia clinica .....</b>	<b>31</b>
B a) Aspetti etici e normativi.....	31
B b) Fase preanalitica, estrazione e quantificazione del DNA .....	31
B c) Analisi della concordanza.....	31
B d) Risultati e discussione .....	31
B e) Bibliografia.....	34

# Mentype<sup>®</sup> DIPquant

## 1. Utilizzo conforme

Le applicazioni Mentype<sup>®</sup> **DIPquant** sono indicate nella diagnostica in vitro basata sulla tecnologia PCR real-time (qPCR) per la specifica analisi molecolare allelica e quantitativa del chimerismo a seguito di trapianto allogenico di midollo osseo e cellule staminali ematiche mediante polimorfismi da delezioni / inserzioni (DIP, denominati anche "INDEL", v. 14 Bibliografia).

Le applicazioni Mentype<sup>®</sup> **DIPquant** sono destinate esclusivamente all'utilizzo professionale in laboratori specializzati. Il personale deve essere qualificato per le tecniche di qPCR e per l'uso dei dispositivi diagnostici in vitro.

## 2. Informazioni base

L'analisi molecolare del chimerismo a seguito di trapianto di midollo osseo e cellule staminali ematiche è decisiva per monitorare la crescita delle cellule trapiantate e per riconoscere tempestivamente eventuali reazioni di rigetto. L'analisi molecolare del chimerismo può essere eseguita per mezzo dell'identificazione dei polimorfismi individuali da delezione / inserzione che, rispetto ad altri motivi di sequenza del DNA, sono particolarmente adatti per l'analisi mediante qPCR su specifici alleli.

Unitamente all'identificazione dei loci DIP informativi del paziente e del donatore con il kit CE-IVD Mentype<sup>®</sup> **DIPscreen** è possibile effettuare anche l'analisi quantitativa del chimerismo mediante i test singleplex Mentype<sup>®</sup> **DIPquant**. Il formato flessibile dei test consente sia l'analisi di singoli campioni sia di grandi quantità di campioni con un consumo minimo di materiale. Poiché l'alta sensibilità della metodica qPCR è combinata a una limitata precisione nell'area del chimerismo misto, si raccomanda di analizzare i campioni caratterizzati da chimerismo misto con il kit Mentype<sup>®</sup> **DIPscreen** (linee guida per il trapianto allogenico di cellule staminali del gruppo di lavoro tedesco per il trapianto di midollo osseo e cellule staminali ematiche (DAG-KBT); Bader *et al.* 2016).

## 3. Descrizione del prodotto Mentype<sup>®</sup> DIPquant

Grazie al test singleplex Mentype<sup>®</sup> **DIPquant** allele-specifico è possibile esaminare singolarmente 55 alleli DIP oltre a due regioni del cromosoma Y (cfr. Tabella 1). Il gene della  $\beta$ -globina funge da riferimento (REF) per la quantificazione relativa. I parametri della qPCR sono impostati a livello universale e consentono a Mentype<sup>®</sup> **DIPquant** di eseguire l'analisi di diversi alleli ricevente specifici parallelamente per più campioni di pazienti in uno stesso run di qPCR.

Il calcolo del chimerismo avviene secondo il metodo  $\Delta\Delta C_p$  [ $C_p$  (*crossing point*) per gli strumenti qPCR Roche Lightcycler<sup>®</sup>, secondo il valore  $C_t$  (*cycle threshold*) per altri sistemi di qPCR]. Per la quantificazione relativa del chimerismo è quindi necessaria la misurazione

parallela del **gene di riferimento**  $\beta$ -globina (*house-keeping*) dello specifico locus del ricevente.

Per la calibrazione dell'analisi si deve analizzare il DNA del ricevente, estratto prima del trapianto (**calibratore**), insieme al test di riferimento ( $\beta$ -globina) e al rispettivo test qPCR dell'allele specifico del ricevente (cfr. paragrafo 9.1).

### 3.1 Strumento qPCR

I test Mentype® **DIPquant** sono stati verificati e validati con il sistema per PCR real-time Roche Lightcycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, CH).

L'impiego del test Mentype® **DIPquant** su altri strumenti per qPCR deve essere verificato e validato dall'utente.

### 3.2 Tipo di campione

Mentype® **DIPquant** è stato validato con il DNA estratto da sangue intero - citrato.

Il prodotto Mentype® **DIPquant** è validato per una quantità di 250 ng di DNA per ogni reazione. L'impiego di quantità superiori di DNA deve essere validato dall'utente.

### 3.3 Sensibilità/Specificità

#### 3.3.1 Intervallo di misura del chimerismo

L'intervallo di misura ottimale dei campioni di chimerismo con test qPCR Mentype® **DIPquant** dipende dalla metodica ed è compreso tra lo 0,05 % - 12,5 % della quota di DNA del donatore o del ricevente nel campione del paziente (campione misto). In questo intervallo si può utilizzare l'impostazione per qPCR descritta nel paragrafo 9.2. Per campioni > 12,5 % per la quota di DNA del ricevente o del donatore, così come per i campioni di chimerismo misto, si raccomanda di aumentare il numero di replicati o di utilizzare Mentype® **DIPscreen**.

#### 3.3.2 Sensibilità e specificità

Il limite di rilevabilità e di sensibilità del test Mentype® **DIPquant** dipende dalla quantità e dalla qualità del DNA stampo utilizzato. Nella Tabella 1 è illustrata la sensibilità del marcatore allele-specifico del Mentype® **DIPquant** nella miscela di DNA. Le miscele sono state utilizzate con una quantità di DNA di 250 ng; il DNA minoritario era omozigote per il marcatore allele-specifico di Mentype® **DIPquant**.

Il valore massimo Cp mostrato nella Tabella 1 indica l'intervallo entro cui era possibile analizzare specificamente i segnali del test Mentype® **DIPquant**.

**Tabella 1** Limiti di rilevazione specifici del test Mentype® DIPquant

Sensibilità e specificità del test Mentype® DIPquant								
Equivalente cellulare alleli DIP/PCR	5	Valore Cp max.	10	Valore Cp max.	20	Valore Cp max.	80	Valore Cp max.
Concentrazione [pg/PCR]	31,5		63		126		500	
Quota in 250 ng/PCR [%]	0,013		0,025		0,05		0,2	
Test HLD Mentype® DIPquant	23-I	36,7	67-I	37,7	82-I	33,5	79-I	31,1
	38-I	36,3	82-D	33,9	105-D	33,7	152-D	35,5
	48-I	36,5	84-D	38,0	140-I	35,0		
	53-D	37,5	101-I	37,4	301-D	32,5		
	53-I	35,0	103-D	37,2				
	67-D	36,2	104-D	34,1				
	70-D	32,5	131-D	33,6				
	70-I	35,6	131-I	34,2				
	84-I	37,3	305-D	33,9				
	88-D	35,6						
	88-I	31,6						
	91-D	34,1						
	91-I	35,2						
	97-I	36,4						
	101-D	35,7						
	103-I	36,6						
	104-I	35,5						
	105-I	34,5						
	106-D	36,9						
	106-I	34,2						
	110-I	35,6						
	112-I	34,8						
	114-D	35,5						
	114-I	37,4						
	116-D	35,9						
	116-I	34,6						
	128-D	35,4						
	128-I	32,7						
	133-I	35,9						
	134-D	35,3						
	134-I	35,6						
	163-D	35,2						
163-I	35,0							
301-I	35,9							
304-D	36,0							
305-I	35,6							
307-D	35,9							
307-I	37,5							
310-D	36,3							
REF	36,0							
SMCY	36,3							
SRY	36,6							

#### 4. Avvertenze e indicazioni per la sicurezza

In questo kit per test è contenuta la seguente sostanza potenzialmente pericolosa:

**Tabella 2** Componenti potenzialmente pericolosi dei kit Mentype® DIPquant

Componenti del kit	Sostanza chimica	Pericolo
Reaction Mix D	Azoturo di sodio $\text{NaN}_3$	Tossico se ingerito, forma gas velenosi in caso di contatto con acidi

Consultare la scheda tecnica di sicurezza (MSDS) dei prodotti Biotype® che possiamo inviare su richiesta ([support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)). Rivolgersi ai rispettivi produttori per le schede tecniche di sicurezza dei reagenti che non sono contenuti nel kit.

Leggere attentamente queste istruzioni per l'uso prima di utilizzare il prodotto.

Dopo il ricevimento del prodotto verificare la completezza del contenuto e dei componenti in relazione alla quantità, al tipo e all'imbottigliamento (v. paragrafo 5.1), alla corretta denominazione, allo stato di congelamento dei reagenti e all'integrità dei relativi imballaggi.

Durante l'esecuzione del test indossare guanti, un camice da laboratorio e una maschera di protezione.

Evitare la contaminazione dei campioni con nucleasi (DNasi / RNasi) utilizzando punte per pipette monouso prive di DNasi / RNasi e dotate di filtri assorbenti per l'aerosol.

Utilizzare superfici di lavoro separate per la preparazione dei campioni (pre-PCR), per la preparazione della miscela master così come per il trattamento e l'analisi dei campioni (post-PCR). Conservare i controlli positivi fisicamente separati dai componenti del kit.

A seconda delle linee guida o regolamenti locali, regionali e/o statali o di organizzazioni accreditate possono essere richiesti altri controlli.

Non utilizzare i componenti del kit e non mescolare i lotti se la data di scadenza è stata superata.

Smaltire i rifiuti provenienti da campioni e test in conformità alle disposizioni locali sulla sicurezza.

#### 4.1 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. Contattare l'indirizzo e-mail [info@biotype.de](mailto:info@biotype.de) per qualsiasi domanda sull'assicurazione di qualità.



## 5. Materiali forniti

### 5.1 Contenuto del kit

I kit Mentype® **DIPquant** contengono i seguenti componenti, sufficienti per la realizzazione di un massimo di 100 reazioni.

**Tabella 3** Dimensioni della confezione e componenti contenuti nei kit Mentype® **DIPquant**, \* Disponibile solo come test di riferimento Mentype® **DIPquant**, # xxx definisce il codice articolo specifico per il locus

Didascalia	Contenuto	Volumi per dimensioni della confezione	
		25 reaz.	100 reaz.*
Nuclease-Free Water	Acqua priva di nucleasi	1,5 mL	2 x 1,5 mL
Reaction Mix D	Miscela di reazione D	125 µL	500 µL
<b>Mentype® DIPquant</b> -HLDxxx#-D/-I Primer Mix -SRY Primer Mix -SMCY Primer Mix -Reference Primer Mix	Miscela primer	63 µL	250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Multi Taq 2 DNA polimerasi	10 µL	40 µL

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.

### 5.2 Informazioni per l'ordine

Inviare l'ordine scritto all'indirizzo e-mail [sales@biotype.de](mailto:sales@biotype.de). L'ordine deve contenere i codici d'ordine secondo la Nota: la confezione in formato 50 delle reazioni non è più in vendita.

**Tabella 4** e Tabella 14, pagina 22.

Nota: la confezione in formato 50 delle reazioni non è più in vendita.

**Tabella 4** Forma generale dei codici d'ordine dei test Mentype® **DIPquant**, \* xx definisce il codice d'ordine del test Mentype® **DIPquant** per lo specifico locus

Mentype® <b>DIPquant</b>	25 reazioni	Cod. ordine	45-015xx*-0025 (*cfr. Tabella 14)
Mentype® <b>DIPquant</b> Reference	100 reazioni	Cod. ordine	45-01591-0100

### 5.3 Reagenti e dispositivi richiesti e non inclusi nel kit

Per la selezione dei test Mentype® **DIPquant** informativi per specifici donatori e pazienti è disponibile il seguente kit in PCR multiplex:

**Tabella 5** Dati per l'ordine del kit di genotipizzazione Mentype® **DIPscreen**, \* yyy definisce la dimensione della confezione

Reagente	Fornitore	Numero di ordinazione
Mentype® <b>DIPscreen</b> (genotipizzazione)	Biotype GmbH	45-45410-0yyy*

**Nota:** i siti di legame del primer dei test Mentype® **DIPquant** sono differenti da quelli del kit Mentype® **DIPscreen**. In rari casi possono verificarsi mutazioni nei siti di legame del primer che possono produrre dropout allelico (*allelic dropout*). Per questo motivo possono sussistere differenze di genotipizzazione tra il test Mentype® **DIPquant** e il test Mentype® **DIPscreen**. Perciò, i risultati del Mentype® **DIPscreen** devono essere sempre verificati tramite i test informativi preselezionati Mentype® **DIPquant** prima di essere usati per il controllo del chimerismo (v. anche paragrafo 9.1).

Per l'amplificazione qPCR sono necessari i seguenti materiali e strumenti:

- Strumento idoneo per PCR real-time (cfr. paragrafo 3.1)
- Kit idoneo per l'estrazione del DNA (cfr. paragrafo 7.2.1)
- Strumento idoneo per la misura quantitativa della concentrazione di DNA dopo l'estrazione e la purificazione (cfr. paragrafo 7.2.1)
- Centrifuga da banco con rotore per provette da 2 mL
- Piastre di reazione da 96 pozzetti o provette di reazione (in caso di utilizzo di piastre di reazione da 96 pozzetti utilizzare anche coperchi o pellicole adatti e una centrifuga con rotore per micropiastre)
- Vortex, adatto per piastre di reazione da 96 pozzetti o provette di reazione
- Pipette e puntali per pipette con filtro (monouso)
- Guanti monouso privi di polvere

**Nota:** assicurarsi che tutti i dispositivi siano installati, mantenuti e calibrati secondo le indicazioni del produttore. Accertarsi che tutti i reagenti per l'uso del rispettivo strumento per qPCR siano presenti (v. istruzioni per l'uso del produttore del rispettivo strumento).

## 6. Conservazione

I kit Mentype® **DIPquant** vengono spediti in ghiaccio secco. I componenti del test sono forniti congelati. Se uno o più componenti dovessero risultare scongelati al ricevimento, o se le provette risultassero danneggiate a causa del trasporto, rivolgersi a Biotype GmbH ([support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)).

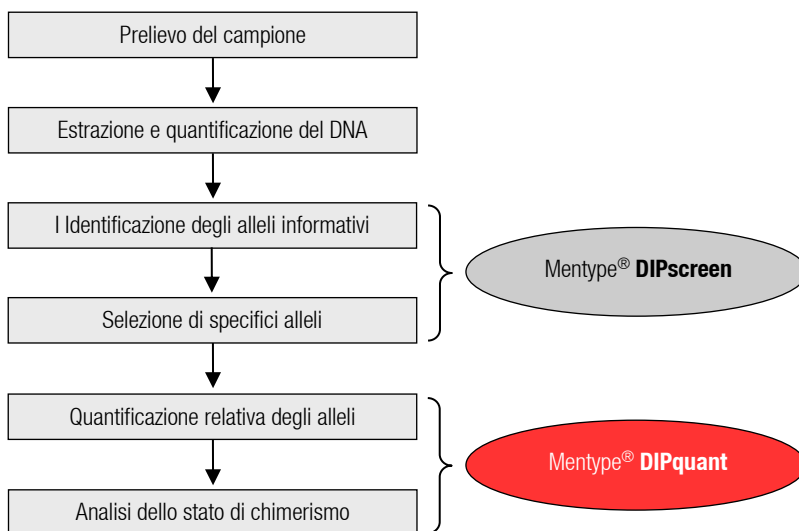
La conservazione dei componenti deve avvenire ad una temperatura tra -25 °C e -15 °C. Si devono evitare lo scongelamento e il congelamento frequenti. Non superare il numero massimo di 8 cicli di scongelamento/congelamento.

I kit Mentype® **DIPquant** devono essere conservati al riparo dalla luce.

La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta della confezione.

## 7. Procedura di lavoro

### 7.1 Panoramica dell'analisi del chimerismo con i prodotti Mentype® DIP



**Figura 1** Dal prelievo del campione all'analisi - L'analisi del chimerismo con le applicazioni Mentype® **DIPscreen** e Mentype® **DIPquant**

## 7.2 Preparazione dei campioni e volume d'impiego del DNA

### 7.2.1 Estrazione del DNA

La qualità del DNA estratto ha un'influenza decisiva sulla resa e sulla qualità del test. È necessario assicurarsi che per l'estrazione del DNA sia utilizzato un metodo/kit compatibile con la tecnologia qPCR.

I seguenti kit sono idonei per l'estrazione del DNA:

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

Si possono utilizzare anche kit alternativi per l'estrazione del DNA, ma la loro idoneità deve essere validata dall'utente.

**Nota:** per ottenere risultati accurati è necessaria la quantificazione del DNA (per es. mediante spettroscopia UV/VIS a 260 nm e determinazione della qualità mediante rapporto  $A_{260} / A_{280}$ , che dev'essere tra 1,7 e 2,0).

### 7.2.2 Utilizzo del DNA stampo

La miscela di primer-allele-specifica è ottimizzata per l'impiego di 250 ng di DNA purificato, corrispondente a 41.666 cellule (6 pg di DNA / cellula). Per ottenere risultati ottimali si raccomanda l'impiego di 250 ng di DNA.

## 7.3 Composizione della miscela master

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

Il volume del DNA da utilizzare dipende dalla sua concentrazione. Per ottenere risultati ottimali la quantità di DNA dovrebbe essere pari a 250 ng per reazione.

Il volume totale del composto per PCR deve essere sempre pari a 25  $\mu$ L.

Tenere conto del controllo positivo e negativo per stabilire il numero di reazioni PCR da allestire. Aggiungere una o due reazioni al numero totale per compensare gli errori di pipettaggio.

La tabella 6 indica i volumi dei componenti del kit impiegati per un volume di campione di 5,0  $\mu$ L (DNA template) e un volume di reazione di 25  $\mu$ L.

**Tabella 6** Composizione della miscela master per una reazione di Mentype® **DIPquant** con l'utilizzo di 5 µL di DNA

Componenti	Volume per reazione qPCR
Nuclease-Free Water	12,1 µL
Reaction Mix D*	5,0 µL
Mentype® <b>DIPquant</b> Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
<b>Volume totale della miscela master</b>	<b>20,0 µL</b>
Template DNA (50 ng/µL)	5,0 µL

\* contiene Mg<sup>2+</sup>, dNTP, BSA

**Nota:** Conservare il DNA diluito in tampone 1 x TE (10 mM Tris HCl, pH 8,0 e 1 mM EDTA) o 0,1 x TE o acqua priva di nucleasi.

### 7.3.1 Controllo positivo

Per il controllo positivo utilizzare, invece dei 5 µL di DNA stampo un DNA di controllo positivo pretipizzato per l'allele specifico di interesse (5 ng/µL). Pipettare il DNA di controllo al posto del DNA stampo nella provetta di reazione con la miscela master per qPCR.

La tabella 7 mostra i volumi dei composti del kit impiegati per un volume di campione di 5,0 µL di DNA di controllo e un volume di reazione di 25 µL.

**Tabella 7** Composizione della miscela master per una reazione di Mentype® **DIPquant** con l'utilizzo di 5 µL di campione di controllo positivo a 5ng/µL

Componenti	Volume per reazione qPCR
Nuclease-Free Water	12,1 µL
Reaction Mix D*	5,0 µL
Mentype® <b>DIPquant</b> Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
<b>Volume totale della miscela master</b>	<b>20,0 µL</b>
DNA di controllo (5 ng/µL)	5,0 µL

\* contiene Mg<sup>2+</sup>, dNTP, BSA

### 7.3.2 Controllo negativo

Come controllo negativo pipettare 5 µL di acqua priva nucleasi al posto del DNA stampo nella provetta di reazione con la miscela master per qPCR.

La tabella 8 mostra i volumi dei componenti del kit impiegati con 5,0 µL di acqua priva di nucleasi e un volume di reazione di 25 µL.

**Tabella 8** Composizione della miscela master del controllo negativo per una reazione di Mentype® **DIPquant**

Componenti	Volume per reazione qPCR
Nuclease-Free Water	12,1 µL
Reaction Mix D*	5,0 µL
Mentype® <b>DIPquant</b> Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
<b>Volume totale della miscela master</b>	<b>20,0 µL</b>
“Acqua priva di nucleasi”	5,0 µL

\* contiene Mg<sup>2+</sup>, dNTP, BSA

## 7.4 Volume di reazione

Pipettare 20 µL di miscela master per qPCR nelle provette di reazione (ottiche) o nella piastra multipozzetto (ottica). Quindi aggiungere 5 µL dello specifico DNA (cfr. schema di pipettaggio nei paragrafi 9.1 e 9.2), oppure 5 µL di controllo positivo o negativo.

Se possibile utilizzare delle piastre per PCR bianche o provettedi reazione per lo strumento qPCR, in modo da ottenere una rilevazione efficiente dei segnali fluorescenti. La migliore rilevazione della fluorescenza può accrescere la sensibilità del test.

Dopo il pipettaggio si devono chiudere le provette di reazione o le piastre multipozzetto (stappi o fogli ottici).

Centrifugare brevemente le miscele di reazione e inserirle per l'analisi nel dispositivo.

## 8. Programma e amplificazione qPCR

### 8.1 Impostazioni del dispositivo e parametri di amplificazione

Creare il protocollo di amplificazione e rilevazione qPCR usando i parametri elencati di seguito. Le specifiche impostazioni del dispositivo sono reperibili nel manuale del produttore o rivolgendosi al nostro servizio di assistenza tecnica ([support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)).

### 8.2 Parametri di rilevazione

Il 6-FAM funge da colorante fluorescente reporter per tutti i test. Prestare attenzione alla scelta del corretto set di filtri nel software del dispositivo per PCR real-time.

### 8.3 Parametri di amplificazione qPCR\*

Per attivare la multi Taq2 DNA polimerasi e sopprimere la formazione di prodotti aspecifici di amplificazione è assolutamente necessario eseguire un "hot start".

**Tabella 9** Parametri di amplificazione qPCR per l'esecuzione del test Mentype® DIPquant

Temperatura	Tempo	
94 °C	4 min (hot start per attivare la Multi Taq2 DNA polimerasi)	
94 °C	30 s	45 cicli
<b>62 °C</b>	<b>45 s</b>	

\* Validato con Roche Light Cycler® LC480 (con velocità di riscaldamento standard di ca. 4,4 °C/s e velocità di raffreddamento di 2,2 °C/s).

La rilevazione dei dati deve avvenire durante la fase di annealing ed elongazione a 62 °C.

Creare un elenco dei campioni (sample sheet) con le impostazioni prescelte.

### 9. Setup consigliato per l'analisi

Per porsi nell'intervallo di misura ottimale della qPCR è necessario quantificare la percentuale del ricevente nel campione misto da analizzare (cfr. paragrafo 3.3.1)

Per la quantificazione relativa del chimerismo si raccomanda di eseguire il test qPCR secondo il seguente schema:

- **3 diversi alleli specifici del ricevente** (Allele of Interest, AOI) in **Duplicati** (v. Tabella 10, Tabella 12, Tabella 13), **o**
- **2 diversi alleli specifici del ricevente** (Allele of Interest, AOI) in **Triplicati** (v. Tabella 11)
- Per ogni DNA e istante è necessario che il **riferimento attivo** (REF, β-globina) sia accompagnato da almeno **duplicati** (meglio se triplicati)
- Un controllo **negativo (NTC)** e un **controllo positivo (PC)** per ogni test

**Tabella 10** Set-up 1: utilizzo di 3 specifici Mentype® DIPquant in duplicati e del test di riferimento Mentype® DIPquant in triplicati

Test	Replicati	Numero di loci analizzati
Specifico test DIPquant	2	3
Test di riferimento (β-globina)	3	-

**Tabella 11** Set-up 2: utilizzo di 2 specifici Mentype® **DIPquant** in triplicati e del test di riferimento Mentype® **DIPquant** in triplicati

Test	Replicati	Numero di loci analizzati
Specifico test DIPquant	3	2
Test di riferimento (β-globina)	3	-

### 9.1 Quantificazione prima del trapianto (pre-HSCT)

Prima del trapianto, il DNA del ricevente (calibratore pre-HSCT) deve essere analizzato in qPCRsia per il gene di riferimento (gene della β-globina) che per i test ricevente-specifici per calibrare l'analisi. Il valore di questa quantificazione sarà definito come il livello 100 % del ricevente.

Per garantire la specificità dei singoli test qPCR ricevente-specifici è necessario eseguire un'analisi del DNA del donatore, cui dovrà corrispondere un livello dello 0 %.

**Tabella 12** Esempio di setup di una piastra multipozzetto prima del trapianto (calibratore)

	1	2	3	4
<b>A</b>	Rif preTx	AOI-1 preTx	AOI-2 preTx	AOI-3 preTx
<b>B</b>	Rif preTx	AOI-1 preTx	AOI-2 preTx	AOI-3 preTx
<b>C</b>	Rif NTC	AOI-1 NTC	AOI-2 NTC	AOI-3 NTC
<b>D</b>	Rif PC	AOI-1 PC	AOI-2 PC	AOI-3 PC
<b>E</b>		AOI-1 Donatore*	AOI-2 Donatore*	AOI-3 Donatore*
<b>F</b>		AOI-1 Donatore*	AOI-2 Donatore*	AOI-3 Donatore*

Rif: test di riferimento; AOI 1-3: test specifico del ricevente; preTx: campione del ricevente pre-trapianto come calibratore; donatore\*: campione opzionale del donatore come test di specificità; NTC: No Template Control; PC: Positive Control

### 9.2 Quantificazione dopo il trapianto / monitoraggio (post-HSCT)

Il monitoraggio del chimerismo deve avvenire sul DNA fresco del paziente, estratto da prelievi ad opportuni intervalli temporali per il monitoraggio. Per un'analisi affidabile il riferimento deve essere accompagnato da tre alleli specifici del ricevente così come da controlli positivi e negativi (cfr. sotto).



**Tabella 13** Esempio di setup di una piastra multipozzetto dopo il trapianto (monitoraggio)

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>A</b>	Rif Monitoraggio 1	AOI-1 Monitoraggio 1	AOI-2 Monitoraggio 1	AOI-3 Monitoraggio 1
<b>B</b>	Rif Monitoraggio 1	AOI-1 Monitoraggio 1	AOI-2 Monitoraggio 1	AOI-3 Monitoraggio 1
<b>C</b>	Rif NTC	AOI-1 NTC	AOI-2 NTC	AOI-3 NTC
<b>D</b>	Rif PC	AOI-1 PC	AOI-2 PC	AOI-3 PC

Rif: test di riferimento; AOI 1-3: test specifico del ricevente; monitoraggio 1: primo campione di monitoraggio dopo il trapianto; NTC: No Template Control; PC: Positive Control;

## 10. Valutazione

### 10.1 Analisi dei dati

Esaminare l'intero andamento delle curve di amplificazione di qPCR. L'analisi dettagliata dei dati grezzi dipende dal dispositivo real-time usato.

La definizione dei valori soglia "baseline noise level" deve essere impostata o in base a specificicicli predefiniti (per es. 3-15). Utilizzare l'**NTC** per determinare il rispettivo valore soglia.

Poiché si utilizza il metodo  $\Delta\Delta C_p$  per la quantificazione, i valori soglia singolarmente impostati non hanno alcun effetto sui risultati, a condizione che tutti i test di un campione siano analizzati con lo stesso valore soglia.

Le informazioni per l'esportazione dei dati sono reperibili nel manuale del produttore del dispositivo real-time. Esportare il nome del campione ("Sample name") e i valori  $C_p$  per i calcolisuccessivi.

### 10.2 Controllo dei risultati

La qPCR ha successo se i valori  $C_p$  del controllo positivo corrispondono a quelli della Tabella 1 e se i controlli negativi non mostrano segnali di amplificazione  $< 45$  cicli.

Utilizzando il DNA del donatore per il controllo della specificità del test non si deve rilevare alcun segnale al di sotto dei valori  $C_p$  limite riportati nella Tabella 1.

## 11. Quantificazione

Qualora sia necessario analizzare manualmente i dati è opportuno ricorrere al metodo della quantificazione relativa. I valori soglia specifici impostati durante l'analisi dei dati grezzi non hanno alcun effetto sulla quantificazione con il metodo  $\Delta\Delta C_p$ , a condizione che tutti i test di un campione siano analizzati con lo stesso valore soglia.

Utilizzare l'**NTC**, per determinare il rispettivo valore soglia.

### Calcolo

#### 11.1 Quantificazione dei campioni pre-HSCT

1. Calcolare i singoli valori  $C_p$  per il riferimento (REF) e gli alleli informativi "Alleles of Interest" (AOI) relativi al DNA del ricevente.
2. Calcolare il  $\Delta C_p$  per ogni AOI rispetto al REF ( $\Delta C_p C = C_p \text{ AOI} - C_p \text{ REF}$ )
3.  $\Delta C_p$  fornisce il valore del calibratore ( $\Delta C_p C$ ) per il calcolo post-HSCT (come 100 % ricevente)

#### 11.2 Quantificazione dei campioni post-HSCT

1. Calcolare i singoli valori  $C_p$  per il riferimento (REF) e gli alleli informativi "Alleles of Interest" (AOI) relativi al DNA del paziente.
2. Calcolare il  $\Delta C_p$  per ogni AOI rispetto al REF ( $\Delta C_p C = C_p \text{ AOI} - C_p \text{ REF}$ )
3. Questo  $\Delta C_p$  è utilizzato per il calcolo del campione sconosciuto ( $\Delta C_p U$ )
4. Calcolare  $\Delta\Delta C_p$  per la quantificazione del chimerismo ( $\Delta\Delta C_p = \Delta C_p U - \Delta C_p C$ )
5. Calcolare la % della componente del ricevente in funzione dell'efficienza della qPCR; % ricevente =  $((1+E)^{-\Delta\Delta C_p}) \times 100$ . Se l'efficienza della qPCR è del 100 %, utilizzare la formula semplificata  $(2^{-\Delta\Delta C_p}) \times 100$ .

## 12. Interpretazione di risultati insoliti

### 12.1 Bassa intensità o assenza di segnale

Uno o più componenti non sono stati aggiunti al composto di reazione: controllare l'amplificazione del controllo positivo e se necessario ripetere la qPCR.

È stato utilizzato un test errato per l'analisi: accertarsi che i test impiegati siano compatibili con gli alleli specifici del ricevente.

Condizioni subottimali della qPCR: controllare le impostazioni della qPCR. Assicurarsi del buon esito dell'attivazione della Multi Taq 2 polimerasi a 94 °C per 4 min. Controllare la temperatura di annealing e di elongazione e assicurarsi che la velocità di riscaldamento del dispositivo sia impostata a 4 °C/s e la velocità di raffreddamento a 2 °C/s.

La qPCR è stata inibita: gli inibitori della PCR non sono stati completamente rimossi dal DNA estratto. Assicurarsi che la purificazione del DNA sia avvenuta in modo accurato secondo le istruzioni del produttore del kit. Purificare di nuovo il DNA o diluire lo stampo. Ripetere la qPCR con il DNA purificato o diluito.

La raccolta di dati non è andata a buon fine: accertarsi che la raccolta di dati di fluorescenza sia avvenuta al momento giusto e nel canale di fluorescenza corretto. Controllare le impostazioni del dispositivo in relazione al colorante fluorescente utilizzato per il test (6-FAM e ROX).

Problemi relativi alla baseline o al valore soglia: impostare il valore soglia al di sopra del background aspecifico per ottenere valori Cp accurati. Utilizzare la procedura descritta nel manuale del produttore del dispositivo per PCR. Se possibile, regolare manualmente le impostazioni per la baseline e il valore soglia.

Degradazione del DNA stampo: durante la purificazione del campione e durante la conservazione può avvenire la degradazione del DNA. Conservare il DNA in 1 x o 0,1 x TE o acqua priva di nucleasi. Utilizzare il DNA di controllo per verificare il funzionamento corretto del test.

Degradazione dei componenti della qPCR: controllare la data di scadenza dei componenti utilizzati e le loro condizioni di conservazione. Evitare il congelamento e scongelamento frequenti della miscela del primer per > 8 cicli e assicurarsi che la conservazione dei componenti sia avvenuta a temperature comprese tra -25 °C e -15 °C.

### 12.2 Oscillazioni dell'intensità del segnale all'interno dei replicati

Errore di pipettaggio: evitare gli errori di pipettaggio mediante un controllo periodico dei set di pipette.

Volumi insufficienti di mastermix: durante la composizione della miscela master aggiungere 1-2 reazioni extra per compensare la precisione di pipettaggio. Mescolare accuratamente i componenti con il vortex e centrifugare brevemente (10 s). Pipettare non meno di 5 µL di DNASTampo.

La qPCR è stata inibita: gli inibitori della PCR non sono stati completamente rimossi durante l'estrazione del DNA. Assicurarsi che la purificazione durante l'estrazione del DNA avvenga accuratamente secondo le istruzioni del produttore. Purificare di nuovo il DNA o diluire lo stampo. Ripetere la qPCR con il DNA purificato/diluito.

La baseline o il valore soglia sono stati impostati in modo errato: impostare il valore soglia al di sopra del background aspecifico per ottenere valori Cp accurati. Utilizzare la procedura descritta nel manuale del produttore del dispositivo per qPCR. Se possibile, regolare manualmente le impostazioni per la baseline e il valore soglia.

Ridotta sensibilità: l'impiego di ridotte quantità di DNA (la quantità ottimale è di 250 ng) può diminuire la sensibilità e la riproducibilità nei replicati. Quantificare il DNA utilizzato secondo la raccomandazione del paragrafo 7.2.1.

Segnali nel controllo negativo: per escludere qualsiasi contaminazione utilizzare puntali con filtro a tenuta di aerosol / "barrier tip" o "screw-cap tube". Ripetere la qPCR con l'acqua priva di nucleasi utilizzata. Conservare i reagenti pre-PCR e post-PCR separati tra loro. Se possibile, pipettare la miscela di reazione e il DNA in spazi diversi.

### **12.3 Segnali di test specifici del ricevente nel DNA del donatore**

Impiego di quantità eccessive (> 250 ng) di DNA stampo: ridurre la quantità di DNA stampo a 250 ng. La concentrazione del DNA deve essere determinata prima dell'allestimento della reazione.

Comparsa di segnali falsi negativi: in rari casi mutazioni presenti nei siti di legame del primer possono provocare dropout allelici. Nella genotipizzazione con il Mentype® **DIPscreen** possono verificarsi quindi risultati falsi negativi (cfr. paragrafi 5.3, 9.1). Poiché i siti di legame del primer del test Mentype® **DIPquant** sono diversi da quelli del test Mentype® **DIPscreen**, nella qPCR possono invece comparire segnali specifici per l'allele. Ma questo dev'essere controllato prima dell'impiego nel monitoraggio del chimerismo di un test Mentype® **DIPquant** selezionato

### 13. Informazioni per l'ordine

**Tabella 14** Informazioni dettagliate per l'ordinazione dei test Mentype® **DIPquant** specifici per allele, \*  
Disponibile anche nella confezione da 100 reazioni (45-01591-0100)

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

<b>DIPquant Assay</b>	<b>25 reazioni</b>
HLD112-I	45-01516-0025
HLD114-D	45-01517-0025
HLD114-I	45-01518-0025
HLD116-D	45-01519-0025
HLD116-I	45-01520-0025
HLD128-D	45-01523-0025
HLD128-I	45-01524-0025
HLD131-D	45-01525-0025
HLD131-I	45-01526-0025
HLD133-I	45-01528-0025
HLD134-D	45-01529-0025
HLD134-I	45-01530-0025
HLD140-I	45-01532-0025
HLD152-D	45-01533-0025
HLD163-D	45-01535-0025
HLD163-I	45-01536-0025
HLD301-D	45-01539-0025
HLD301-I	45-01540-0025
HLD304-D	45-01541-0025
HLD305-D	45-01543-0025
HLD305-I	45-01544-0025
HLD307-D	45-01545-0025
HLD307-I	45-01546-0025
HLD310-D	45-01549-0025

## 14. Bibliografia

**Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, Lamy T, Le Prise PY, Beauplet A, Bories D, Semana G, Quelvennec E, (2002)** Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 99, 4618-4625.

**Bader P, Bornhäuser M, Grigoleit U, Kröger N, (2016)** Leitlinien zur allogenen Stammzelltransplantation (SZT) von der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantationen (DAG-KBT), Kapitel X: Monitoring nach allogener SZT – Chimärismusanalyse und Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) [https://www.dag-kbt.de/files/downloads/Leitlinien\\_Kap-10\\_Monitoring%20nach%20allogener%20SZT.pdf](https://www.dag-kbt.de/files/downloads/Leitlinien_Kap-10_Monitoring%20nach%20allogener%20SZT.pdf).

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

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

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

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

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

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

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



## 15. Marchi ed esclusione di responsabilità

I nomi, marchi ecc. registrati utilizzati in questo documento devono essere considerati protetti, anche se non espressamente indicati come tali: Biotype®, Mentype® (Biotype GmbH); LightCycler® (Roche Diagnostics International AG); QIAamp® (QIAGEN GmbH); NucleoSpin® (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG); FAM™, ROX™ (Life Technologies Ltd.).

I test Mentype® **DIPscreen** e Mentype® **DIPquant** sono kit con marchio CE secondo la direttiva europea 98/79/CE per i dispositivi diagnostici in vitro. I kit non sono disponibili come dispositivi diagnostici in vitro al di fuori di questo ambiregulatorio.

## 16. Simboli



**Produttore**



**Riferimento alle istruzioni per l'uso in formato elettronico**



**Numero di ordinazione**



**Dispositivo medico per diagnostica in vitro**



**Sufficiente per <N> test**



**Utilizzabile fino al**



**Limite di temperatura**



**Tenere in un luogo asciutto**



**Proteggere dalla luce**



**Denominazione del lotto**

## Verifica e validazione dei kit di amplificazione qPCR Mentype® DIPquant

### A Dati analitici dell'efficacia (verifica)

#### A a) DNA umano

Per tutti gli esperimenti di verifica è stata usata una biobanca di oltre 100 campioni di DNA umano provenienti da sangue venoso EDTA. I campioni provenivano da volontari non imparentati che avevano fornito il loro consenso scritto. Per la preanalitica, l'estrazione e la quantificazione del DNA v. la sezione B b).

#### A b) Specificità analitica e Limit of Blank (LoB)

**Obiettivo:** il prodotto è composto da 57 test per marcatori biallelici autosomici, due marcatori del cromosoma Y e il gene di riferimento. La specificità dei test Mentype® DIPquant specifici per gli alleli e il cromosoma Y deve essere garantita in presenza di un'eccedenza del DNA stampo con l'allele alternativo o il cromosoma X, rispettivamente.

**Metodica:** Per ciascun test qPCR Mentype® DIPquant sono stati raccolti i dati della qPCR in tempo reale di controlli negativi (NTC,  $n \geq 12$ ), controlli con 250 ng di DNA omozigote per l'allele alternativo o 250 ng di DNA femminile (nel caso di marcatori Y specifici) ( $n \geq 9$ ), che non dovrebbero generare segnali.

**Risultati:** tutti gli NTC non hanno mostrato alcun segnale falso positivo prima di 45 cicli. Nel caso dei 250 ng di DNA omozigote per l'allele alternativo o di DNA femminile, 26 test qPCR Mentype® DIPquant non hanno presentato alcun segnale prima di 45 cicli. Gli altri test hanno presentato segnali aspecifici prima di 45 cicli. Tuttavia, è stata osservata una distribuzione stocastica tra 1 e 6 falsi positivi entro 9 misurazioni parallele. Quindi l'approccio non-parametrico è stato impiegato per calcolare il LoB (CSLI 2012, dati non riportati).

#### A c) Sensibilità analitica e Limit of Detection (LoD)

**Obiettivo:** sono stati eseguiti alcuni esperimenti per determinare il limite di rilevabilità (LoD) analitico di tutti i test per qPCR.

**Metodica:** il calcolo per verificare il criterio di qualità del LoD ai fini dell'esclusione di risultati falsi positivi è stato effettuato in base all'equazione  $LoB - (LoD + 2 \times \delta) \geq 2$ , dove LoB è il valore Cp che, secondo A a) è determinato in modo non parametrico; LoD è il valore Cp medio di misurazioni positive, e  $\delta$  è la deviazione standard del LoD. Sono state realizzate miscele di DNA per tutti i test allele-specifici utilizzando 250 ng di DNA omozigote per l'allele alternativo o 250 ng di DNA femminile (nel caso di marcatori Y specifici) per ogni PCR e quantità diverse di DNA omozigote dell'alleled'interesse. Il numero di ripetizioni è stato pari a 6 (3 in due giorni diversi).

**Risultati:** per prima cosa sono stati aggiunti 31,5 pg di DNA dell'allele d'interesse (corrispondenti allo 0,01 % dell'allele minore) nel DNA base. Nei casi in cui non è stato possibile raggiungere il criterio di accettazione della qualità sono stati eseguiti ulteriori esperimenti con 63 pg (0,025 % dell'allele minore), 126 pg (0,05 % dell'allele minore) e 500 pg (0,2 % dell'allele minore). I risultati di tutti i test qPCR sono illustrati nella Tabella 1.

#### **A d) Intervallo di misura dei test**

**Obiettivo:** è stato determinato l'intervallo di misura lineare dei test.

**Metodica:** gli esperimenti hanno raccolto tutti i dati di A b) e A c). Inoltre sono state misurate le diluizioni in serie dei plasmidi ricombinanti che codificano le regioni del DNA degli alleli di interesse nell'intervallo tra 5 e 5 120 copie per reazione. In totale sono state realizzate 11 diluizioni, inclusi i controlli senza stampo (NTC), e il numero di ripetizioni è stato pari a 6 (3 in due giorni diversi).

**Risultati:** per tutti i test è stato definito un intervallo di misura lineare di  $24 \leq Cp \leq LOD$ . Un valore Cp di 24 con 5 120 copie dell'allele target, corrispondente al 12,5 % del DNA minoritario in una miscela con un totale di 250 ng di DNA per reazione.

#### **A e) Oscillazioni dei lotti e prestazioni dei test di LoD**

**Obiettivo:** i rapporti delle concentrazioni dei componenti del buffer PCR della miscela di reazione D della Multi Taq 2 polimerasi sono decisivi per la sensibilità, la specificità e l'equilibrio dei segnali nella qPCR. Quindi, è stato testato l'effetto della variazione dei lotti di questi componenti del kit.

**Metodica:** sono stati testati quattro lotti della miscela di reazione D e tre lotti di MultiTaq2 DNA polimerasi. I test Mentype® **DIPquant** HLD53-I, Mentype® **DIPquant** HLD84-I, Mentype® **DIPquant** HLD101-I, Mentype® **DIPquant** HLD70-D e Mentype® **DIPquant** HLD88-D sono stati usati a scopo esemplificativo per le misurazioni. La qPCR è stata eseguita in condizioni standard con DNA di controllo (General Positive Control, Biotype GmbH) a due diverse concentrazioni di DNA (50 pg per reazione PCR e 5 ng per reazione PCR). Per ciascuna concentrazione sono stati testati tre campioni paralleli. Inoltre sono stati eseguiti tre bianchi (NTC) per ogni test DIPquant di ciascun lotto.

**Risultati:** i risultati sono illustrati nella Tabella 15 e nella Tabella 16.

**Tabella 15** Variazione tra quattro lotti della miscela di reazione D

Test Mentype® <b>DIPquant</b>	5 ng di DNA stampo		50 pg di DNA stampo	
	Cp medio	$\delta$	Cp medio	$\delta$
HLD53-I	28,66	0,06	34,36	2,19
HLD84-I	28,31	0,44	36,75	2,95
HLD101-I	29,59	0,04	36,59	2,48
HLD70-D	27,83	0,05	34,46	1,26
HLD88-D	28,92	0,07	35,96	0,65

**Tabella 16** Variazione fra tre lotti di Multi Taq2 DNA polimerasi

Test Mentype® <b>DIPquant</b>	5 ng di DNA stampo		50 pg di DNA stampo	
	Cp medio	$\delta$	Cp medio	$\delta$
HLD53-I	28,54	0,11	32,21	0,85
HLD84-I	28,71	0,69	37,82	2,69
HLD101-I	29,56	0,18	34,99	0,51
HLD70-D	27,92	0,05	34,99	0,51
HLD88-D	29,01	0,09	35,79	0,52

#### A f) **Misurazione in due giorni diversi**

**Obiettivo:** le misurazioni sono state eseguite in due giorni diversi per dimostrare l'effetto del pipettaggio di due miscele master indipendenti e dello strumento sulle prestazioni del test.

**Metodica:** per la simulazione di possibili errori di pipettaggio da parte dell'utente sono state confrontate oscillazioni di volume del  $\pm 10\%$  del tampone PCR e Multi Taq 2 rispetto alla reazione standard con 3 volumi eccedenti e 3 difettosi. La qPCR è stata eseguita in condizioni standard con DNA di controllo (General Positive Control) in due diverse concentrazioni di DNA (50 pg per reazione PCR e 5 ng per reazione PCR). Per ciascuna concentrazione sono stati testati tre campioni paralleli. Inoltre sono stati eseguiti tre bianchi (NTC) per ogni test DIPquant e per ciascun lotto.

**Risultati:** I possibili errori di pipettaggio con una oscillazione di volume del  $\pm 10\%$  non hanno alcun effetto sul rendimento del test Mentype® **DIPquant** con 5 ng di GPC. Il criterio di accettazione è stato raggiunto per tutti i test e per ogni errore di pipettaggio simulato. Non si è verificato alcun errore e non sono stati osservati prodotti secondari aspecifici.

Utilizzando 50 pg di GPC per reazione sono possibili più ampie variazioni  $> 2$  Cp. Pertanto, è obbligatorio utilizzare pipette calibrate.

#### **A g) Conservabilità dopo l'apertura**

**Obiettivo:** la stabilità dei reagenti del kit per qPCR è stata testata dopo ripetuti congelamenti e scongelamenti. In tal modo si riproduce l'effettivo utilizzo di routine del prodotto in una procedura simulata (accelerata).

**Metodica:** a titolo esemplificativo sono stati scelti quattro test Mentype® **DIPquant**. Le miscele di primer e sonde sono state sottoposte a 8 cicli di congelamento e scongelamento. Il congelamento è stato eseguito a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  per almeno 30 minuti. Lo scongelamento è avvenuto a temperatura ambiente e i reagenti sono stati omogeneizzati prima dell'uso. Infine è stata eseguita una reazione standard. Al fine di evitare un ulteriore effetto dovuto all'uso di DNA diversi si è utilizzato il DNA di controllo (GPC) come stampo. Per il test sono stati selezionati due diverse concentrazioni di DNA (50 pg per reazione PCR e 5 ng per reazione PCR). Per ciascuna concentrazione sono stati testati tre campioni paralleli. Inoltre sono stati eseguiti tre NTC per ogni test Mentype® **DIPquant**.

**Risultati:** il congelamento e lo scongelamento frequenti non hanno alcun effetto negativo sulle prestazioni dei test DIPquant. La rilevazione mediante la miscela di primer e sonde è possibile anche dopo 8 cicli di congelamento e scongelamento. I valori Cp variano in modo minimo. La deviazione è nel range atteso per le oscillazioni del termociclatore qPCR.

## **B            Dati di efficacia clinica**

### **B a)        Aspetti etici e normativi**

È stato eseguito uno studio della valutazione di efficacia secondo gli articoli da 20 a 24 della legge tedesca suidispositivi medici. 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 (autorità nazionale competente). Il protocollo è stato autorizzato dalla commissione etica di un centro studi clinici. Tutti i partecipanti erano adulti, sui juris, che avevano fornito il proprio consenso informato per iscritto.

### **B b)        Fase preanalitica, estrazione e quantificazione del DNA**

Sono stati usati campioni di sangue venoso ETDA (per es. S-Monovette K2E, Sarstedt AG & Co. KG, Nuembrecht, DE). L'estrazione del DNA da sangue intero è stato eseguito con il kit QIAamp® DNA Blood Mini (Qiagen GmbH, Hilden, DE) secondo le istruzioni del produttore. Le concentrazioni di DNA sono state determinate mediante spettroscopia di assorbimento nell'ultravioletto visibile a 260 nm.

### **B c)        Analisi della concordanza**

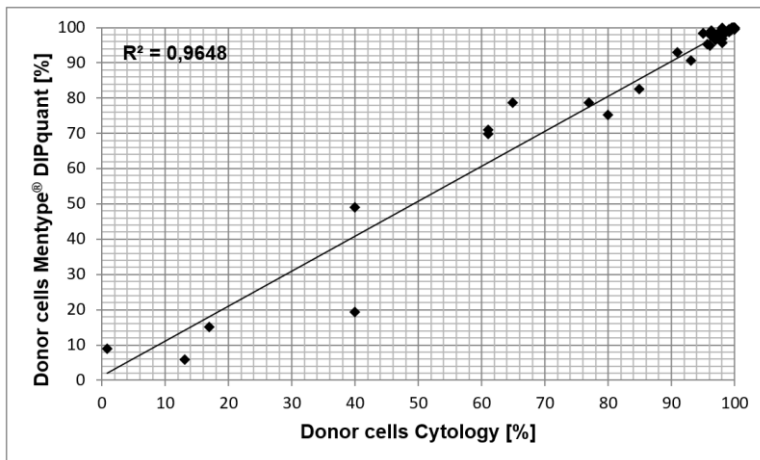
Tutti i pazienti hanno ricevuto un trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche da donatore di sesso opposto, per consentire la genotipizzazione con ibridazione a fluorescenza in situ (FISH) con il kit gonosoma-specifico CE-IVD CEP® X SpectrumOrange / Y SpectrumGreen™ Direct Labeled Fluorescent DNA Probe (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, DE). L'analisi del con PCR del chimerismo è stata eseguita con Mentype® **DIPquant** (qPCR), Mentype® **DIPscreen** (Biotype GmbH), una PCR multiplex in combinazione con elettroforesi capillare mediante ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, US-CA) e Mentype® **Chimera**® (Biotype GmbH), una PCR multiplex in combinazione con elettroforesi capillare mediante ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer. Col kit Mentype® **DIPquant** sono stati usati 250 ng di DNA per ogni reazione. Tutti i kit sono stati utilizzati secondo le istruzioni del produttore.

### **B d)        Risultati e discussione**

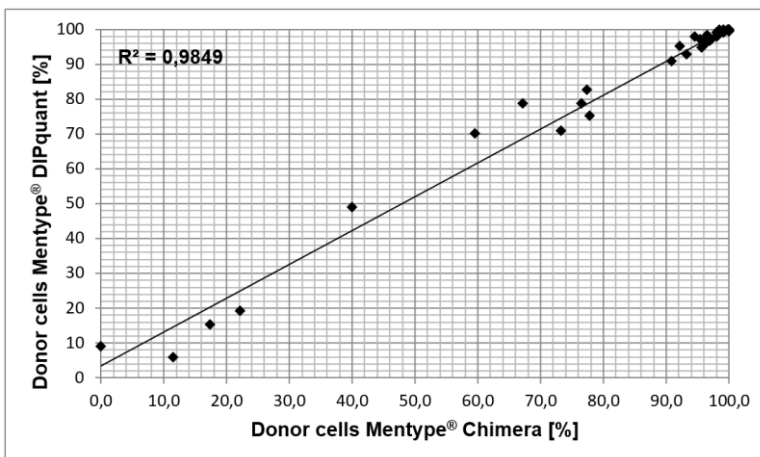
In primo luogo sono stati determinati tutti i sistemi STR e DIP informativi della coppia donatore/ricevente. Inoltre, il sesso è stato confermato mediante la genotipizzazione con il marcatore dell'amelogenina, che fa parte dei test Mentype® **DIPscreen** e Mentype® **Chimera**®. In totale sono stati prelevati 54 campioni di sangue EDTA da 6 pazienti in giorni diversi dopo il trapianto di cellule staminali ematiche. Il valore medio di tutti i biomarcatori STR e DIP (2-7) è stato usato per l'analisi del chimerismo in caso di genotipizzazione mediante PCR multiplex in combinazione con elettroforesi capillare. Nel caso dell'analisi con Mentype® **DIPquant** sono stati selezionati tre test qPCR informativi e il gene di

riferimento, in conformità al paragrafo 10.2 delle istruzioni per l'uso, per essere analizzati in duplicato. In generale sono stati determinati gli alleli presenti nella quota minoritaria.

I risultati della comparazione sono illustrati nelle Figura 2 a Figura 4.

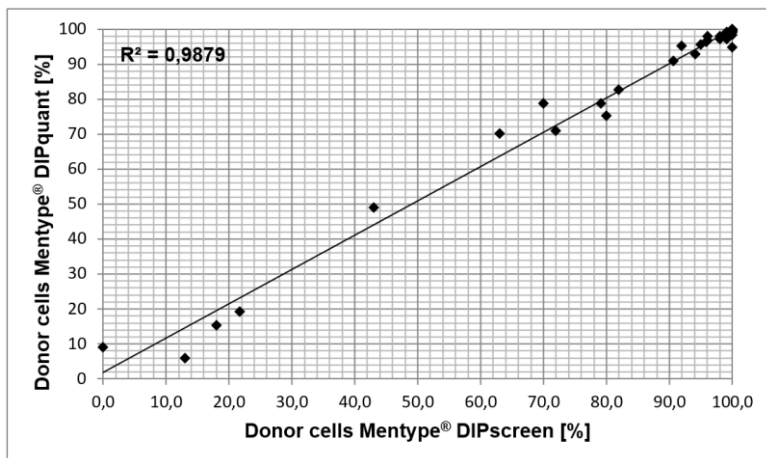


**Figura 2** Comparazione del test Mentype® DIPquant con la citologia nell'analisi del chimerismo



**Figura 3** Comparazione del test Mentype® DIPquant e del test Mentype® Chimera® nell'analisi del chimerismo





**Figura 4** Comparazione del test Mentype® **DIPquant** con il test Mentype® **DIPscreen** nell'analisi del chimerismo

Il coefficiente di determinazione (R al quadrato) di Mentype® **DIPquant** rispetto a FISH, Mentype® **Chimera**® e Mentype® **DIPscreen** era rispettivamente pari a 0,9648, 0,9849 e 0,9879. La migliore concordanza è stata ottenuta con Mentype® **DIPscreen** che possiede gli stessi biomarcatori; una ridotta concordanza con la FISH è indice di differenze tecniche. Secondo le istruzioni per l'uso del produttore si dovrebbero contare almeno 200 cellule. Tuttavia con più di 500 cellule è possibile ottenere risultati migliori (Buño et al. 2005), anche se non con tutti i campioni.

La validità scientifica di tutti i biomarcatori per l'analisi del chimerismo è stata dimostrata spesso in letteratura (Thiede et al. 2001; Thiede e Lion 2001; Wilhelm et al. 2002; Buño et al. 2005). I test basati su PCR sono già accettati nelle linee guida cliniche (Bader et al. 2016). Innanzitutto è stato utilizzato il test FISH come comparatore. Questa tecnica continua ad avere valore nell'ambito di trapianti in cui i generi sessuali non coincidono. Tuttavia presenta soltanto una sensibilità dell'1 % per la popolazione cellulareminore. La PCR multiplex, basata sulle ripetizioni brevi in tandem (STR), come in Mentype® **Chimera**®, è indicata spesso come la metodica di riferimento nell'analisi del chimerismo (Bader et al. 2016). I biomarcatori biallelici come i DIP offrono dei vantaggi tecnici come l'assenza di picchi stutter nell'elettroforesi capillare o la loro idoneità per la qPCR con la quale è possibile ottenere sensibilità inferiori allo 0,1 % (Wilhelm et al. 2002; Bader et al. 2016).

**B e) Bibliografia**

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

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

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

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

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

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

**Biotype GmbH**

Moritzburger Weg 67

01109 Dresden

Tel. +49 351 8838 400

Fax +49 351 8838 403

[info@biotype.de](mailto:info@biotype.de)

[www.biotype.de](http://www.biotype.de)