

Mentype[®] DIPscreen

Istruzioni per l'uso

**Il primo passo verso la quantificazione di
campioni di chimerismo**

Prodotto medico per diagnostica in vitro



DISIFU01v1it
Luglio 2020



45-45410-0025
45-45410-0100
45-45410-0400



Lotto



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
D-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

Descrizione del prodotto

Mentype® **DIPscreen** è un test PCR multiplex per l'identificazione di loci DIP per la differenziazione donatore/ricevente successivamente a trapianto allogenico di cellule staminali. Questo test consente lo screening dello stato degli alleli per un totale di 33 loci DIP biallelici e del marcatore sessuale amelogenina.

L'analisi molecolare del chimerismo è decisiva per monitorare la crescita delle cellule staminali trapiantate e per riconoscere tempestivamente eventuali reazioni di rigetto. L'analisi molecolare del chimerismo può essere eseguita su diverse sequenze di DNA. Lo studio dei polimorfismi di inserzione/delezione del DNA (considderati DIP/INDEL) presenta un grande vantaggio rispetto ad altri motivi di sequenze del DNA, grazie al fatto che l'amplificazione dei primi evita la formazione di artefatti "stutter peak" (picchi aspecifici); inoltre, i polimorfismi DIP sono molto adatti per l'analisi quantitativa mediante la tecnologia qPCR. Una diagnosi basata sui DIP è quindi in grado di consentire un'analisi precisa e altamente quantitativa dello stato del chimerismo.

I 33 loci DIP esaminati sono distanziati di almeno 10 Mbp l'uno dall'altro e sono distribuiti in 18 cromosomi (Tabella 1). Il limite di rilevazione del Mentype® **DIPscreen** è di **200 pg di DNA genomico**. L'intervallo ottimale per l'analisi, nelle condizioni standard, è tra 1,0 e 2,0 ng di DNA. I primer sono marcati con fluorocromi **6-FAM**, **BTG** e **BTY**.

La validazione e la valutazione del test sono state effettuate sui dispositivi GeneAmp® 9700 Silver (modalità MAX), Eppendorf Mastercycler ep-S, Biometra T1, ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer con l'utilizzo di capillari di 36 cm e il polimero POP4®.

Indice

1. Descrizione del Mentype® DIPscreen	5
2. Amplificazione PCR.....	9
2.1 Composizione della miscela master	9
2.2 Parametri di amplificazione PCR.....	10
3. Elettroforesi capillare su gel	11
3.1 Preparazione dei prodotti per PCR.....	11
3.2 Analisi della lunghezza dei frammenti	11
4. Analisi.....	13
4.1 File templatato Biotype®.....	14
4.2 Controlli.....	15
4.3 Lunghezze dei frammenti e alleli	16
5. Interpretazione dei risultati.....	20
6. Bibliografia.....	21
7. Spiegazione dei simboli.....	22
8. Specifiche del kit di amplificazione PCR Mentype® DIPscreen	23
A Validazione analitica	23
A a) Determinazione della reazione standard e delle tolleranze specifiche del lotto 23	
A b) Test della precisione di genotipizzazione	23
A c) Test della specificità analitica.....	24
A d) Test della sensibilità analitica.....	24
A e) Test di diversi termociclatori per PCR	24
A f) Test con campioni di DNA misto.....	25
A g) Test dell'influenza di diverse temperature di annealing nella PCR	25
A h) Test di diversi lotti di buffer per PCR.....	25
A i) Test della stabilità a breve termine	26
B Dati di efficacia clinica.....	26
B a) Prelievo dei campioni: aspetti etici e normativi	26
B b) Test di comparazione	26
B c) Estrazione e purificazione del DNA	27
B d) Risultati	27
B e) Bibliografia	29

1. Descrizione del Mentype® DIPscreen

Tabella 1. Informazioni specifiche dei loci indagati da Mentype® DIPscreen

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

Abbreviazioni: HLD = locus DIP umano, -DIP = delezione, +DIP = inserzione

La tabella 1 mostra la posizione cromosomica, la sequenza e l'allele di riferimento dei loci DIP rilevati con Mentype® DIPscreen.

Indice

Mentype® DIPscreen

Descrizione	Componente	Volume		
		25 reazioni	100 reazioni	400 reazioni
Nuclease-Free Water	Acqua priva di nucleasi	1,5 mL	2x 1,5 mL	6x 1,5 mL
Reaction Mix A	Miscela di reazione A	125 µL	500 µL	2x 1,0 mL
Mentype® DIPscreen PrimerMix	Miscela primer	125 µL	500 µL	4x 500 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	Multi Taq 2 DNA polimerasi	15 µL	60 µL	4x 60 µL
Mentype® DIPscreen Control DNA XY13 (2 ng/µL)	DNA di controllo XY13 (2 ng/µL)	10 µL	10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Standard di lunghezza del DNA 550 (BTO)	13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder	Ladder allelico	25 µL	25 µL	4x 25 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.

Informazioni per l'ordine

Tabella 2. Informazioni per l'ordine dei kit Mentype® DIPscreen

Nome del prodotto	Confezionamento	Codice di ordinazione
Mentype® DIPscreen	25 reazioni	45-45410-0025
Mentype® DIPscreen	100 reazioni	45-45410-0100
Mentype® DIPscreen	400 reazioni	45-45410-0400

Conservazione

La conservazione deve avvenire ad una temperatura tra -25 °C e -15 °C. Si devono evitare lo scongelamento e il congelamento ripetuti. La miscela del primer e il ladder allelico devono essere conservati al riparo dalla luce. Il DNA di controllo e i reagenti post-PCR (ladder allelico e standard di lunghezza del DNA) devono essere conservati separatamente dai reagenti PCR. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta della confezione.

Reagenti addizionali

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

Tabella 3. Reagenti aggiuntivi necessari per il Mentype® DIPscreen

Reagente	Fornitore	Codice di ordinazione
Formamide Hi-Di™, 25 mL	Applied Biosystems	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

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

Consultare la scheda tecnica di sicurezza.

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

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 impiego senza limitazioni. Vi preghiamo di contattarci per qualsiasi domanda sull'assicurazione di qualità.

Marchi e brevetti

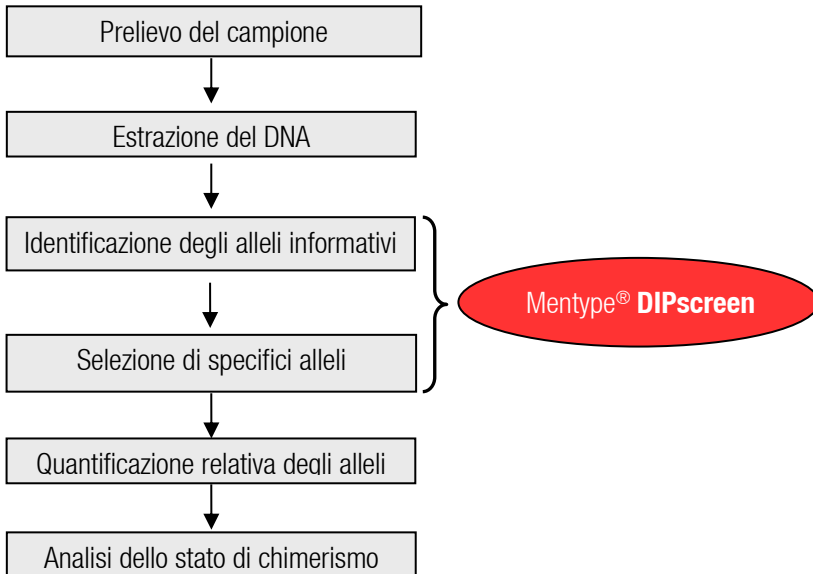
Mentype® è marchio registrato della Biotype GmbH.

ABI PRISM®, GeneMapper®, GeneAmp® e Applied Biosystems® sono marchi registrati della Applied Biosystems LLC.

POP4® 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).

Panoramica dell'analisi del chimerismo con Mentype® DIP



Dal prelievo dei campioni all'analisi – l'analisi del chimerismo con l'utilizzo dell'applicazione Mentype® **DIPscreen**

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

2. Amplificazione PCR

2.1 Composizione della miscela master

La seguente tabella mostra i volumi dei componenti del kit impiegati per l'allestimento di una reazione di 25 μL con 1,0 μL di DNA templatato. Tenere conto del controllo positivo e negativo nel calcolo del numero di reazioni PCR da allestire. Aggiungere una o due reazioni al numero totale per compensare gli errori di pipettaggio.

Tabella 4. Composizione della miscela master Mentype® DIPscreen

Componenti	Volume
Nuclease-Free Water	13,4 μL
Reaction Mix A*	5,0 μL
Mentype® DIPscreen PrimerMix	5,0 μL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/ μL)	0,6 μL
Volume totale della miscela master	24,0 μL
Inserimento del DNA stampoe dei controlli	1,0 μL

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

Tutti i reagenti devono essere mescolati bene (con ilvortex) e brevemente centrifugati (circa 10 s) prima dell'allestimento della miscela master.

La quantità del DNA impiegato è calcolata in base alla sua concentrazione. È generalmente sufficiente 1 μL per i campioni critici con una ridotta concentrazione di DNA è possibile aumentare relativamente la quantità dello stampo. Il volume di acqua priva di nucleasi deve essere corretto in modo che il volume totale della reazione 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.

La miscela primer è preparata in modo che in **28 cicli di PCR con 1 ng di DNA di controllo XY13** in un volume di reazione di 25 μL sia raggiunta un'altezza del picco equilibrata. Se si utilizza più DNA stampo, si possono osservare picchi molto alti nei frammenti di PCR corti e picchi proporzionalmente più bassi nei frammenti di PCR più lunghi. Ridurre la quantità di DNA per correggere questo squilibrio.

DNA stampo

La quantità ottimale di DNA è pari a **1-2 ng per reazione**. Il valore misurato della concentrazione di DNA può variare secondo il metodo di quantificazione utilizzato, perciò la quantità ottimale di DNA deve essere eventualmente adattata.

Controllo positivo

Per il controllo positivo diluire il DNA di controllo XY13 a 1 ng/ μL nel volume corrispondente. Pipettare il DNA di controllo diluito al posto del DNA stampo nel recipiente di reazione con la miscela master PCR presente.

Controllo negativo

Come controllo negativo pipettare l'acqua priva di nucleasi, al posto del DNA templato, nella provetta di reazione con la miscela master PCR presente.

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 28 cicli di PCR per tutti i campioni.

Metodo standard

Consigliato per tutti i campioni di DNA

Tabella 5. Protocollo di amplificazione standard per l'esecuzione di Mentype® DIPscreen

Temperatura	Tempo	
94 °C	4 min	(hot start per l'attivazione della multi Taq2 DNA polimerasi)
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	28 cicli
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	fino alla fine

Osservazione: per un equilibrio ottimale si consiglia di impostare le velocità di riscaldamento e raffreddamento del dispositivo PCR a circa 4-5 °C/s.

In caso di quantità insufficiente di DNA si possono verificare errori statistici (allelic dropout) e altezze del picco non bilanciate. Inoltre, potrebbe aumentare 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 cyclor e centrifugarli brevemente. Scongellare i reagenti formamide Hi-Di™ (non contenuti nel kit) e DNA Size Standard 550 (BTO), miscelare brevemente le provette e centrifugarle brevemente. Preparare la miscela descritta nella Tabella 6 con formamide Hi-Di™ e il DNA Size Standard 550 (BTO), quindi aggiungere una o due reazioni per compensare gli errori di pipettaggio.

Tabella 6. Composizione della miscela di denaturazione

Componenti	Volumi per reazione
Formamide Hi-Di™	12,0 µL
DNA 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 (compatibile col sequenziatore). Quindi aggiungere 1 µL di prodotto PCR o 1 µL di ladder allelico di Mentype® **DIPscreen** in ogni pozzetto. Chiudere la piastra per PCR con una pellicola adatta, miscelare nel vortice e centrifugare brevemente. Rimuovere la pellicola e chiudere la piastra con il setto del produttore del dispositivo.

Nota: il ladder allelico è usato per determinare correttamente i frammenti analizzati durante l'analisi dei dati. In ogni corsa di analisi della lunghezza dei frammenti il ladder allelico deve essere inserito 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 le sonde dei capillari non pescano in tutte le posizioni, 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 cyclor per PCR per 3 minuti a 95 °C, quindi raffreddare i campioni nel cyclor 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 7. Parametri di corsa specifici per l'analisi della lunghezza dei frammenti del Mentype® DIPscreen

	ABI 310	ABI 3130	ABI 3500
Injections Voltage [kV]	15.0	3.0	3.0
Run Time	26 min	1500 s	1500 s
Injection Time [s]	5	10	10

Diversamente dai valori riportati nella Tabella 7, il tempo di corsa può essere adattato per analizzare tutti i frammenti (60-550 bp) del size standard 550.

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. Analisi

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

Osservazione: nell'interpretazione del Mentype® **DIPscreen** 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. Per garantire un'analisi accurata si deve utilizzare il maggior numero possibile di punti di taratura distribuiti uniformemente per la 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.

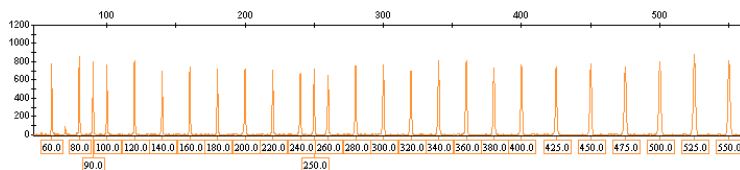


Fig. 1 Elettroferogramma dello standard di lunghezza del DNA 550 (BTO), lunghezze dei frammenti in bp

Osservazione: per la valutazione e l'analisi del Mentype® **DIPscreen** con il software *GeneMapper*® ID/ID-X può essere utilizzato il file template dello standard di lunghezza del DNA SST-BTO_60-450 bp.

4.1 File template Biotype®

L'assegnazione degli alleli di tutti i prodotti PCRseparati (genotipizzazione) può avvenire con l'aiuto di un software adatto per la valutazione, per es. con GeneMapper® ID/ID-X insieme ai file templati Mentype® **DIPscreen** di Biotype.

I file templati Biotype® (Template Files) sono reperibili sulla nostra homepage (www.biotype.de). Su richiesta potremo inviare anche un CD-ROM.

I modelli Biotype® consigliati per il software GeneMapper® sono:

Panels	DIPscreen_Panels_v0/v0X	o versione superiore
BinSets	DIPscreen_Bins_v0/v0X	o versione superiore
Size Standard	SST-BTO_60-450bp	
Analysis Method	Analysis_DIPscreen_310_1000rfu	
	Analysis_DIPscreen_310_200rfu	
	Analysis_DIPscreen_3130_1000rfu	
	Analysis_DIPscreen_3130_200rfu	
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 alleles	

I pannelli e BinSets devono essere sempre usati, mentre gli altri file templati sono opzionali. I templati Biotype® per il software GeneMapper® ID/ID-X sono stati generati per le corse con POP4®. Per l'utilizzo di altri tipi di polimeri devono essere apportate eventuali modifiche al pannello e ai BinSet così come al metodo di analisi prima che i dati siano analizzati. Istruzioni dettagliate sono reperibili nella nostra homepage (www.biotype.de) come download (Biotype® Template File for GeneMapper®).

Nota importante: l'importazione e l'assegnazione degli alleli con i file templati forniti può essere garantita solamente per il software GeneMapper® ID/ID-X: se si utilizza GeneMapper® possono presentarsi problemi durante l'importazione di alcuni file templati. In questo caso, i pannelli e i Bin devono essere calibrati con uno o più corse dell ladder allelico per l'aggiustamento alla specifica configurazione del dispositivo in uso. Contattare il nostro supporto per ottenere assistenza (support@biotype.de).

Metodi di procedimento generali per l'analisi

1. Controllo dello standard di lunghezza (size standard)
2. Controllo del ladder allelico (allelic ladder)
3. Verifica del controllo positivo
4. Verifica del controllo negativo
5. Analisi e interpretazione dei dati del campione

4.2 Controlli

Il DNA di controllo XY13 contenuto nel Mentype® **DIPscreen** così come i DNA disponibili sul mercato rappresentano i seguenti alleli:

Tabella 8. Determinazione degli alleli del Mentype® **DIPscreen**

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

Il DNA di riferimento K-562 è disponibile presso ATCC. I DNA 9947A, 9948 e 3657 possono essere acquistati presso Coriell Cell Repositories

4.3 Lunghezze dei frammenti e alleli

I valori riportati nella Tabella 9 per la lunghezza dei frammenti di ogni singolo allele si riferiscono al DNA standard di lunghezza 550 (BTO) all'analisi sull'ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer con polimero POP4®. In caso di utilizzo di altri dispositivi per l'analisi, standard di lunghezza del DNA o polimeri, possono esserci divergenze nella lunghezza dei frammenti.

Inoltre, si consiglia un controllo visivo del ladder allelico.

Scala

Orizzontale: 70-430 bp (v. Figg. 2 e 3)

Verticale: secondo l'intensità di segnale del campione

Figura 2

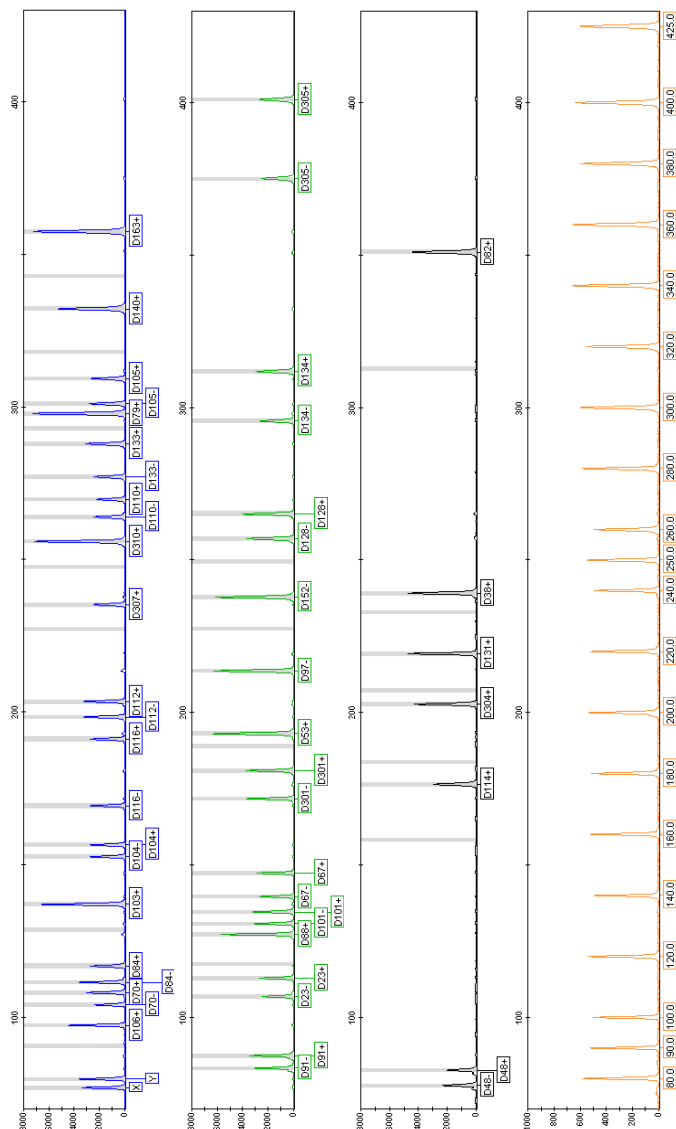


Fig. 2 Elettroferogramma del Mentype® DIPscreen con l'utilizzo di 1 ng di DNA di controllo XY13. L'analisi è stata eseguita su un ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer con POP4® e lo standard di lunghezza del DNA BTO 550. L'assegnazione degli alleli è stata eseguita con il software GeneMapper® ID e il Template File Mentype® DIPscreen.

Figura 3

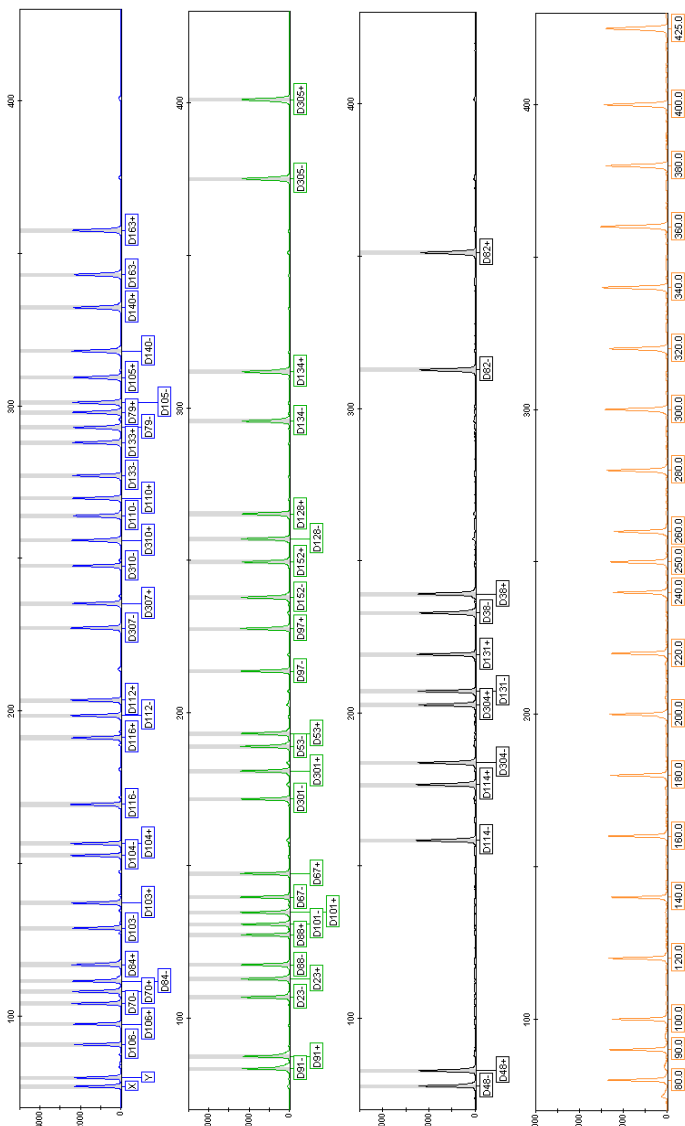


Fig. 3 Elettroferogramma del ladder allelico Mentype® **DIPscreen** analizzato su ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer con POP4® e il DNA Size Standard 550 (BTO). L'assegnazione degli alleli è stata eseguita con il software GeneMapper® ID e il Template File Mentype® **DIPscreen**.

Tabella 9. Lunghezze dei frammenti del ladder allelico Mentype® **DIPscreen** ottenute su ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer con polimero POP4® (pannello FAM, BTG, BTY)

Marcatore/FA M	-DIP [bp]*	+DIP [bp]*	Marcatore/BT G	-DIP [bp]*	+DIP [bp]*
AM	77 (X)	80 (Y)	HLD91	84	88
HLD106	91	98	HLD23	107	113
HLD70	104	108	HLD88	118	128
HLD84	112	117	HLD101	131	135
HLD103	129	138	HLD67	140	148
HLD104	153	1157	HLD301	172	182
HLD116	170	192	HLD53	190	194
HLD112	199	204	HLD97	214	228
HLD307	228	236	HLD152	239	250
HLD310	248	257	HLD128	258	266
HLD110	264	270	HLD134	296	312
HLD133	278	288	HLD305	375	401
HLD79	294	299			
HLD105	302	310	Marcatore/BT Y	-DIP [bp]*	+DIP [bp]*
HLD140	318	333	HLD48	78	83
HLD163	344	358	HLD114	159	177
			HLD304	184	203
			HLD131	208	220
			HLD38	234	240
			HLD82	314	352

* Arrotondato ai numeri interi

5. Interpretazione dei risultati

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

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 linearità del dispositivo ($> 3\ 000$ RFU) possono verificarsi picchi di pull-up. Essi sono riconoscibili in quanto compaiono nella stessa posizione di picchi specifici, ma in canali di fluorescenza diversi (generalmente con minore intensità di segnale). Le altezze dei picchi dovrebbero superare le $3\ 000$ RFU per prevenire picchi di pull-up.

Aggiunta di nucleotidi indipendente dal template

La Multi Taq DNA polimerasi, a causa dell'attività terminal transferasica, tende ad aggiungere un'adenosina all'estremità 3' del frammento di DNA amplificato. Questo artefatto è riconoscibile dalla presenza di picco relativo a un frammento più corto di una base (picco -1 bp). Tutti i primer Biotype® sono disegnati 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 ($68\ ^\circ\text{C}$ per 60 in.). L'altezza del picco artefatto aumenta in caso di elevate 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 multicapillari con 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 a temperatura ambiente maggiore eventualmente anche con più campioni di ladder allelico per corsa.

Influenza del tipo di polimero

Mentype® **DIPscreen** è stato validato e certificato su POP4®. L'utilizzo di un altro polimero (per es. POP-7™ o POP-6™) può modificare la corsa dei prodotti specifici di PCR. Inoltre, è stato osservato un maggiore rumore di fondo causato da un diverso comportamento dei residui liberi di fluorocromo.

6. 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.

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

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

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

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

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

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

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

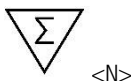
7. Spiegazione dei simboli



Produttore



Lotto



Sufficiente per <N> test



Riferimento alle istruzioni per l'uso in formato elettronico



Utilizzabile fino a



Limitazione di temperatura



Numero di ordinazione



Dipositivo medico per diagnostica in vitro



Proteggere dalla luce



Tenere in un luogo asciutto

8.

8. Specifiche del kit di amplificazione PCR Mentype® DIPscreen

A Validazione analitica

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

Obiettivo: la reazione standard e le tolleranze specifiche del lotto sono state determinate in riferimento all'altezza assoluta dei segnali (RFU), al bilanciamento delle altezze dei segnali della PCR multiplex e dell'baseline.

Metodica: il kit contiene il DNA di controllo XY13 di un donatore sano che è eterozigote in 17 sistemi DIP e amelogenina. La reazione standard (28 cicli di PCR) è stata eseguita con questo DNA di controllo alla concentrazione nominale di 1 ng in quadruplica determinazione. Sono stati eseguiti anche quattro bianchi (no template control, NTC) senza DNA.

Risultati: per le miscele dei primer di PCR lotto-dipendenti sono state stabilite le seguenti specifiche: utilizzando un ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer sono state ottenute altezze di segnale di 1 000-5 000 RFU. Le oscillazioni per le altezze dei segnali di sistemi eterozigoti potevano ammontare a un massimo del 50 % del valore di riferimento. Nell'intervallo di misurazione non è stato osservato alcun segnale aspecifico a 200 RFU (baseline) nei bianchi.

A b) Test della precisione di genotipizzazione

Obiettivo: la precisione dell'assegnazione degli alleli doveva essere statisticamente assicurata nelle condizioni standard. Il test ha verificato l'*allele calling* automatico del ladder allelico e la concordanza della pretipizzazione del DNA di controllo con altri metodi (altri kit per PCR, sequenziamento diretto, ecc.) mediante il software GeneMapper ID. Inoltre, 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) relativamente ai file template di analisi per il sequenziatore di DNA.

Metodica: sono stati esaminati, in test singolo, 100 campioni di DNA pretipizzato di donatori umani 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 > 200 RFU (valutazione manuale) [3; 4].

Risultati: tutti i campioni di DNA sono stati genotipizzati correttamente grazie alle impostazioni specifiche del dispositivo relativamente a tutti i sistemi HLD e al marcatore dell'amelogenina.

A c) Test della specificità analitica

Obiettivo: le analisi avevano 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: non è stata rinvenuta alcuna reattività crociata (< 200 RFU) nella regione degli alleli in esame.

A d) Test della sensibilità analitica

Obiettivo: le analisi avevano lo scopo di stabilire il limite di rivelabilità analitica (sensibilità).

Metodica: è stata testata una serie di diluizioni contenenti da 1 ng a 65 pg di DNA di riferimento in quadruplici determinazioni. Come criterio di accettazione sono stati definiti profili completi di DNA con > 100 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: sono state eseguite reazioni standard con DNA di controllo alla concentrazione nominale di 1 ng con tutti i termociclatori di seguito indicati. I test sono stati eseguiti in quadruplici determinazioni con la stessa miscela master. Inoltre, sono stati esaminati 2 campioni bianchi senza DNA. Termociclatori testati: GeneAmp 9700 con blocco in argento (Applied Biosystems®, Life Technology GmbH, Darmstadt), GeneAmp 9700 con blocco in alluminio (Life Technology GmbH, Darmstadt) ed Eppendorf Mastercycler ep-S (Eppendorf AG, Hamburg)

Risultati: non è stato rilevato alcun prodotto secondario aspecifico > 200 RFU nella regione degli alleli in esame.

La differenza tra le altezze dei picchi rispetto alla reazione standard era al massimo del 20 % ad una velocità di ramping definita di ≥ 2 °C/s.

A f) Test con campioni di DNA misto

Obiettivo: l'obiettivo dell'analisi del chimerismo a seguito di trapianto allogenico di cellule staminali ematiche è la quantificazione relativa dei distinti DNA di donatore e ricevente. Per rilevare la minima malattia residua si dovrebbe poter misurare la minima quantità possibile di DNA del ricevente nella miscela. Nella validazione analitica sono state allestite a tal fine diverse miscele con due DNA definiti e con genotipi diversi.

Metodica: sono state allestite 10 miscele indipendenti con due DNA non imparentati, nelle quali il DNA estraneo era aggiunto in percentuali variabili da 0 %, 1 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 % e 70 %. Tra i due DNA della miscela è stato possibile discriminare mediamente 13 loci DIP ($12,8 \pm 2,22$) con alleli informativi per l'analisi. In ciascun caso, sono stati testati 2 ng della miscela di DNA nella reazione standard (v. paragrafo c). Sono state analizzate altezze di segnale di almeno 50 RFU.

Risultati: per il DNA minoritario è stato possibile raggiungere un limite di rivelabilità dell'1 %, nel range dell'1-5 % ottenuto con i kit STR forensici comunemente impiegati nell'analisi del chimerismo [3-6].

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, è stata alterata di ± 1 °C e ± 2 °C rispetto alla reazione standard con il DNA di controllo alla concentrazione nominale di 1 ng. Quindi è stata eseguita una triplice determinazione con la stessamiscela master.

Risultati: con ± 1 °C non è stato rilevato alcun prodotto secondario aspecifico > 200 RFU nella regione degli alleli in esame. Le altezze dei picchi determinate divergevano per un massimo del ± 30 % a ± 1 °C rispetto alla reazione standard. A + 2 °C sono state registrate forti cadute del segnale in alcuni sistemi (HLD 84, 103, 116, 112, 133, 105, 140, 67, 48) e un sistema (HLD 91) ha fallito completamente.

A h) Test di diversi lotti di buffer per PCR

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

Metodica: sono stati testati 4 lotti indipendenti per la miscela di reazione A è nella reazione standard con il DNA di controllo alla concentrazione nominale di 1 ng.

Risultati: non è stato rilevato alcun prodotto secondario aspecifico > 200 RFU nella regione degli alleli in esame. La differenza delle altezze dei picchi, rispetto alla reazione standard, era pari al 20 %.

A i) Test della stabilità a breve termine

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 a -20 °C per almeno 1 ora. Lo scongelamento è avvenuto a temperatura ambiente e i reagenti sono stati miscelati prima dell'uso. Infine è stata effettuata una reazione standard, in triplice determinazione, con il DNA di controllo alla concentrazione nominale di 1 ng oltre ai 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 a un massimo del 20 % (dovuta specialmente alla perdita di segnale). Nei bianchi sono stati determinati ulteriori picchi > 200 RFU entro la scala di riferimento, ma sempre al di fuori della regione degli alleli in esame (fluorocromi liberi nel pannello BTG).

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. Il protocollo è stato approvato dall'Autorità Nazionale Competente secondo l'articolo 7 del Regolamento sugli studi clinici dei prodotti medicinali e del comitato etico istituzionale. Tutti i partecipanti hanno fornito dichiarazioni di consenso informato.

B b) Test di comparazione

Come test di comparazione è stato utilizzato il kit di amplificazione PCR CE-IVD Mentype® **Chimera**® (Biotype GmbH, Dresda), basato su ripetizioni brevi in tandem (STR) [12]. Inoltre, è stata eseguita una differenziazione citogenetica tra i leucociti del donatore e del ricevente mediante ibridazione a fluorescenza in situ (FISH) [11]. A tale scopo 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

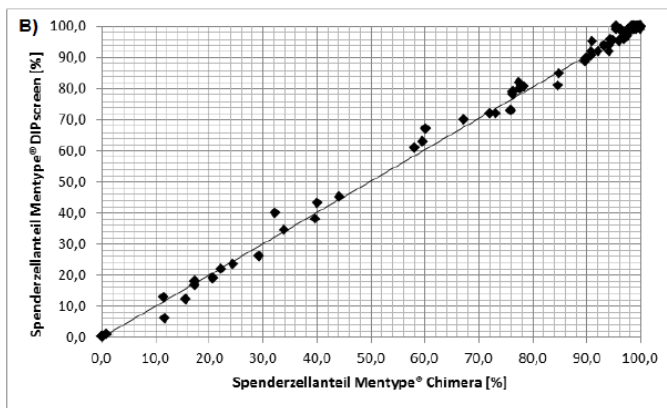
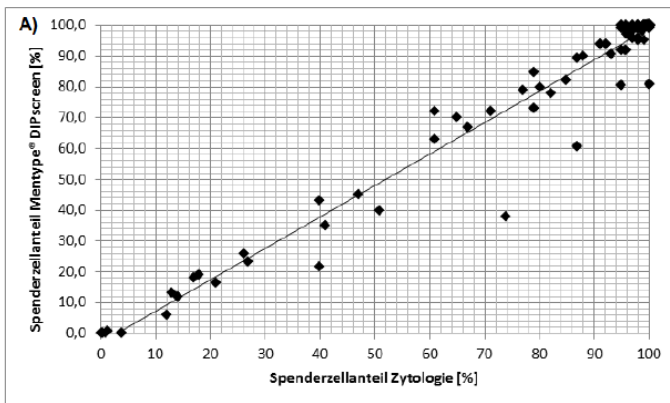
L'estrazione del DNA dal sangue intero eparinizzato è stata effettuata con il *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, DE), secondo le istruzioni del produttore.

B d) Risultati

In totale sono stati raccolti 98 set di dati da pazienti adulti, in giorni diversi, e successivi a 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 alla FISH specifica per i cromosomi sessuali [10]. Sono stati usati almeno 1,5 ng di DNA genomico per ogni PCR. Innanzitutto sono stati determinati tutti i sistemi informativi STR o DIP 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 o DIP [3]. I risultati dei test di comparazione sono raccolti nella Figura 1.

Per quanto riguarda la citogenetica, 11 campioni analizzati con il Mentype® **DIPscreen** presentavano una differenza nella percentuale del donatore superiore al 5 % (assoluto) (v. Fig. 10A). In 5 di questi campioni il conteggio citogenetico delle cellule era chiaramente inferiore a 200. Secondo le raccomandazioni del produttore del kit FISH il conteggio avrebbe dovuto prevedere almeno 200 cellule. Secondo le raccomandazioni pratiche conteggi cellulari ancora più alti (500-1 000) forniscono migliori risultati citogenetici [6, 8]. Contrariamente alla citogenetica, le differenze tra il Mentype® **DIPscreen** e il kit PCR multiplex Mentype® **Chimera**® basato su STR ammontavano al massimo al 7,9 % (v. Fig. 4B). Solo 3 dei 98 set di dati mostravano una divergenza superiore al 5 %.

Fig. 4: Analisi della concordanza tra la PCR Multiplex Mentype® DIPscreen e Mentype® Chimera (B) o tra la prima rispetto alla citologia (A)



B e) Bibliografía

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

Biotype GmbH

Moritzburger Weg 67
01109 Dresden
Tel. +49 351 8838 400
Fax +49 351 8838 403
info@biotype.de
www.biotype.de