

Mentype[®] Chimera[®]

Návod k použití

Nový standard v analýze chimerismu

Diagnostika in vitro



CHNIFU01v2cz
Listopad 2020



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



Označení šarže



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
D-01109 Drážďany
Německo

Vyrobeno v Německu

Biotype GmbH vyvíjí, vyrábí a distribuuje aplikace založené na PCR pro lékařskou diagnostiku.

Naše testovací soupravy Mentype® zaručují nejvyšší standardy kvality pro klinický a výzkum a diagnostiku.

Pro informace a návrhy jsme vám rádi k dispozici. Kontaktujte nás nebo navštivte naši domovskou stránku www.biotype.de

Mentype[®] Chimera[®]

Popis výrobku

Mentype[®] Chimera[®] je multiplexní PCR aplikace vyvinutá pro analýzu chimerismu po transplantaci kmenových buněk krve nebo kostní dřeně. Souprava byla speciálně navržena pro kontrolu růstu dárcovských buněk po transplantaci. Kit Mentype[®] Chimera[®] byl validován analýzou chimérismu na více než 200 HLA kompatibilních párech dárců a příjemců, vhodnost testu byla potvrzena komparativními klinickými studiemi. Souprava je úspěšně používána v rutinní klinické diagnostice.

Genetické markery použité v kitu Mentype[®] Chimera[®] jsou distribuovány na 12 chromozomech a představují vysoce polymorfní mikrosatelity (STR) s vysokou heterozygotností a vyváženou distribucí alel. Tyto vlastnosti zvyšují šanci najít informativní lokusy pro diferenciaci dárce-recipienta, a poskytují spolehlivou a robustní analýzu chimérismu.

Jedna PCR reakce simultánně amplifikuje dvanáct vysoce polymorfních autosomálních lokusů **D2S1360, D3S1744, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517, D8S1132, D10S2325, D12S391, D18S51, D21S2055, SE33 (ACTBP2)** a lokusu **amelogenin** specifický pro pohlaví. Jeden primer pro každý lokus je značen fluorescenčními barvivy **6-FAM, BTG** nebo **BTY**.

Detekční limit kitu Mentype[®] Chimera[®] je **200 pg genomické DNA**. Optimální rozsah při standardních podmínkách je **0,2-1,0 ng DNA**.

Validace a vyhodnocení soupravy bylo provedeno na ermocykleru GeneAmp[®] 9700 Aluminium, Eppendorf Mastercycler ep-S, Biometra, ABI PRISM[®] 310 analyzátoru s POP-4[®] a ABI PRISM[®] 3130 s POP-4[®].

Obsah

1. Popis Mentype® Chimera®	5
2. PCR amplifikace.....	8
2.1 Příprava master mixu	8
2.2 Parametry PCR amplifikace.....	9
3. Kapilární gelová elektroforéza	11
3.1 Příprava produktů PCR	11
3.2 Analýza délky fragmentu (fragmentační analýza)	11
4. Vyhodnocení.....	13
4.1 Biotype® templátové soubory	13
4.2 Kontroly.....	14
4.3 Délky fragmentů a alely.....	15
5. Interpretace výsledků	22
6. Populačně-genetická data	23
7. Reference	26
8. Vysvětlení symbolů	27
Specifikace kitu Mentype® Chimera	28
A Analytická validace	28
A a) Stanovení standardní reakce a tolerance specifické pro šarže	28
A b) Testování přesnosti genotypování	28
A c) Testování analytické specifčnosti.....	29
A d) Testování analytické senzitivity	29
A e) Testování různých PCR termocyklérů	29
A f) Testování různých směsných vzorků DNA	29
A g) Testování vlivu různých teplot annealingu v PCR	30
A h) Testování různých šarží PCR pufrů.....	30
A i) Testování inhibitorů PCR	31
A j) Stabilita po otevření	31
B Zhodnocení klinických parametrů testu	32
B a) Odběr vzorků, etická a regulační hlediska	32
B b) Referenční metody	32
B c) Extrakce DNA a přečištění.....	32
B d) Výsledky	32
B e) Reference.....	33

1. Popis Mentype® Chimera®

Tabulka 1. Přehled lokusů a relevantních informací, Mentype® Chimera®

Lokus	GenBank® Accession	Repeatmotiv reference alel	Referenč ní alela	Oblast alel
Amelogenin X	M55418			
Amelogenin Y	M55419			
D2S1360	G08130	[TATC] ₉ [TGTC] ₉ [TATC] ₅	23	19-32
D3S1744	G08246	[TCTA] ₂ TA[TCTA] ₁₂ TCA [TCTA] ₂	16	13-22
D4S2366	G08339	[ATAG] ₉ ATTG [ATAG] ₂	12	9-15
D5S2500	G08468	[ATAG] ₁₂	12	9-18
D6S474	G08540	[TAGA] ₅ TGA [TAGA] ₁₂	17	11-20
D7S1517	G18365	[GAAA] ₁₁ CAAA [GAAA] ₂ CAAA [GAAA] ₂	17	14-31
D8S1132	G08685	[TCTA] ₉ TCA [TCTA] ₉ TCTGTCTA	20	12.1-27
D10S2325	G08790	[TCTTA] ₁₂	12	6-23
D12S391	G08921	[AGAT] ₅ GAT [AGAT] ₇ [AGAC] ₆ AGAT	19.3	13-28
D18S51	L18333	[AGAA] ₁₃	13	5.3-42
D21S2055	G27274	[CTAT] ₂ CTAA [CTAT] ₉ CTA [CTAT] ₃ TAT [CTAT] ₃ TAT [CTAT] ₄ CAT[CTAT] ₂	24	16.1-39
SE33 (ACTBP2)	NG000840	[AAAG] ₉ AA [AAAG] ₁₆	25.2	3-50

Tabulka 1 ukazuje lokusy STR s jejich opakujícími se motivy a alely. Nomenklatura se řídí směrnicemi Mezinárodní společnosti pro soudní genetiku (ISFG) (Bär et al., 1997). Nomenklatura pro lokusy D8S1132 a D12S391 je definována dle Heringa a Müllera (2001), pro lokusy D4S2366 a D6S474 podle Beckera et al. (2007), pro lokus D10S2325 podle Wieganda et al. (1999) a pro lokus D7S1517 podle Wieganda a Klintschara (2002). Uvedený rozsah alel zohledňuje známé alely Národního institutu pro standardy a technologie (NIST, stav 12/2008) a aktuální literaturu.

Tabulka 2. Chromozomální mapování pro Mentype® Chimera®

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

Obsah kitu

Mentype® Chimera®

Titulek	Obsah	Objem		
		25 Reakce	100 Reakce	400 Reakce
Nuclease-Free Water	Voda neobsahující nukleázy	1,5 mL	2x 1,5 mL	6x 1,5 mL
Reaction Mix A	Reakční směs A	125 µL	500 µL	2x 1,0 mL
Mentype® Chimera® Primer Mix	Směs primerů	63 µL	250 µL	4x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Multi Taq 2 DNA polymeráza	10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® Chimera® Control DNA XY5 nebo Control DNA XY1726	Kontrolní DNA XY5 (2 ng/µL) nebo Kontrolní DNA XY1726 (2 ng/µL)	10 µL	10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	DNA délkový standard 550 (BTO)	13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® Chimera® Allelic Ladder	Alelický marker	25 µL	25 µL	4x 25 µL

Mějte na paměti, že komponenty soupravy z různých šarží soupravy nesmí být smíchány. Přehled čísel šarží je uveden na etiketě, která je umístěna na vnitřní straně klopky krabice. Rozdělování komponent soupravy do jiných reakčních nádob není povoleno.

Informace pro objednání

Poznámka: Mějte prosím na paměti, že reakce o velikosti balení 1000 se již neprodávají.

Mentype® Chimera®	25	Reakce	Obj. č.	45-13210-0025
Mentype® Chimera®	100	Reakce	Obj. č.	45-13210-0100
Mentype® Chimera®	400	Reakce	Obj. č.	45-13210-0400

Skladování

Skladujte všechny komponenty při –25 °C až -15 °C. Je třeba vyhnout se opakovanému rozmrazování a zmrazování. Směs primerů a alelický marker by měly být skladovány chráněně před světlem. Kontrolní DNA a post-PCR reagentie (alelický marker a DNA velikostní standard) by měly být skladovány odděleně od PCR reagentií. Expirace kitu je uvedena na etiketě obalu.

Další potřebné reagentie

K amplifikaci PCR a přípravě vzorků potřebujete kromě komponentů obsažených v kitu i následující reagentie:

Tabulka 3. Další reagentie potřebná k použití Mentype® **Chimera**®

Činidlo	Dodavatel	Objednací číslo
Hi-Di™ formamid, 25 ml	Life Technologies Corporation	4311320
Matrix Standards BT5 single-capillary instruments (5x25 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 (50 µL)	Biotype GmbH	00-10421-0050

Výstrahy a bezpečnostní upozornění

Vezměte prosím na vědomí bezpečnostní list.

Pro komponenty kitu jsou bezpečnostní listy k dispozici na vyžádání. Ohledně bezpečnostních listů reagentií, které nejsou součástí testovací sady, se obraťte na příslušného výrobce.

Do šarže LEUK01073 (Reaction Mix A šarže CH1901224)

PCR amplikační kit obsahuje následující potenciálně nebezpečné látky:

Obsah sady	Chemikálie	Nebezpečí
Reaction Mix A	Azid sodný NaN ₃	při požití toxický, při kontaktu s kyselinou bude vyvíjen toxický plyn

Dodržení a kontrola kvality

Celý obsah testovací soupravy podléhá intenzivní kontrole kvality společnosti Biotype GmbH. Kvalita kitů je průběžně přezkoumávána, aby se prokázala jejich neomezená použitelnost. Kontaktujte nás ve všech otázkách ohledně dodržení a kontroly kvality.

Ochranné známky a patenty

Mentype® a **Chimera**® jsou registrované ochranné známky společnosti Biotype GmbH. ABI PRISM® a GeneScan® jsou registrované ochranné známky společností Applied Biosystems LLC, GeneMapper®, GeneAmp® a Applied Biosystems® jsou registrované ochranné známky společnosti Applied Biosystems LLC.

POP-4® je registrovaná ochranná známka společnosti Applied Biosystems LLC v Evropě.

PCR je chráněno patentem. Vlastníkem patentu jsou společnosti Roche Molecular Systems a firma Hoffmann-La Roche (Roche).

Protokoly pro PCR amplifikaci, elektroforézu a vyhodnocení

2. PCR amplifikace

2.1 Příprava master mixu

Následující tabulka ukazuje objemy použitých PCR reagensí pro reakční objem 25 µL, včetně 1,0 µL vzorku (templátová DNA). Při stanovení počtu PCR reakcí uvažujte také o pozitivní a negativní kontrole. Přidejte k celkovému objemu jednu nebo dvě reakce pro kompenzaci chyb pipetování.

Tabulka 4. Složení master mixu Mentype® Chimera®

Komponenty	Objem
Nuclease-Free Water	16,1 µL
Reaction Mix A *	5,0 µL
Mentype® Chimera® Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Celkové množství reakční směsi	24,0 µL

* obsahuje Mg²⁺, dNTPs, BSA

Před namícháním reakční směsi by měly být všechny reagensie promíchány (vortex) a krátce odstředěny (asi 10 s).

Množství templátové DNA závisí na její koncentraci. Pro referenční vzorky obvykle postačí 1 µL. U kritických vzorků lze odpovídajícím způsobem zvýšit množství templátu. Doplňte konečný reakční objem vodou (nuclease-free) tak, aby byl celkový reakční objem PCR 25 µL.

Uchovávejte své vzorky DNA ve vodě (nuclease-free) nebo ve zředěném TE pufru (10 mM Tris HCl, pH 8,0 a 1 mM EDTA), např. 0,1 x TE pufr.

Primer mixy jsou upraveny pro dosažení optimálních výšek píků při **30 PCR cyklech s 0,5 ng kontrolní DNA XY5 nebo XY1726** v reakčním objemu 25 µL. Pokud se použije více templátové DNA, lze očekávat vyšší píky pro malé fragmenty PCR a relativně nízké píky pro větší fragmenty PCR. Chcete-li tuto nerovnováhu upravit, snižte množství DNA.

Pozitivní kontrola

Poznámka: Od čísla šarže soupravy **LEUK01071** obsahuje souprava novou pozitivní kontrolní DNA **XY1726**. Toto se liší od předchozí kontrolní DNA XY5 ve svém genetickém profilu. Koncentrace a související experimentální postup se nezměnily. Z čísla šarže soupravy a obsahu (uvedeného na štítku krabičky soupravy) můžete určit, která kontrolní DNA je obsažena v soupravě. Nový genetický profil a alely, které mají být detekovány, lze nalézt na Obrázku 2Bx a v Tabulce 9.

Pro pozitivní kontrolu zředit kontrolní DNA XY5 nebo XY1726 na 0,5 ng/µL v příslušném objemu. Pipetujte zředěnou kontrolní DNA do zkumavek obsahujících PCR Master Mix.

Negativní kontrola

Jako negativní kontrolu pipetujte vodu (nuclease-free) místo templátové DNA do zkumavek obsahujících PCR master mix.

Templátová DNA

V závislosti na použité kvantifikační metodě se může změřená hodnota koncentrace DNA lišit, takže může být nutné upravit optimální množství DNA.

2.2 Parametry PCR amplifikace

Proveďte „hot start“ PCR, aby se aktivovala DNA polymeráza Multi Taq 2, která zamezuje tvorbě nespecifických amplifikačních produktů.

Počet cyklů PCR závisí na množství použité DNA. Pro všechny vzorky se obecně doporučuje 30 cyklů PCR. Pro kritické vzorky (< 100 pg DNA) může být počet PCR cyklů navýšen až na 32.

Standardní metoda

Doporučeno pro všechny vzorky DNA

Tabulka 5. Standardní PCR amplifikační protokol

Teplota	Čas	
94 °C	4 minuty (hot start pro aktivaci DNA polymerázy Multi Taq2)	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	30 cyklů
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	do konce

Volitelně

Doporučeno pro nízkou kvantitu DNA

Tabulka 6. Volitelný PCR amplifikační protokol pro vzorky s nízkou koncentrací DNA

Teplota	Čas	
94 °C	4 minuty (hot start pro aktivaci DNA polymerázy Multi Taq2)	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	32 cyklů
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	do konce

Poznámka: U PCR cyklérů s funkcí rychlého ohřevu a chlazení (> 2 °C/s) upravte pro dosažení optimálních výsledků ramping na 2 °C/s.

Velice nízké koncentrace DNA mohou vést k alelickým výpadkům a nevyváženým výškám píku. Navíc se zvyšuje pravděpodobnost nespecifických amplifikačních produktů. Se zvyšujícím se počtem cyklů může dojít také ke zkřížené kontaminaci v důsledku minimálního množství kontaminantů (např. cizí DNA).

3. Kapilární gelová elektroforéza

3.1 Příprava produktů PCR

Po dokončení PCR odeberte vzorky z cykléru a krátce odstřed'te. Rozmrazte reagenty Hi-Di™ formamid (není součástí soupravy) a DNA Size Standard 550 (BTO), zkumavky krátce promíchejte a krátce odstřed'te. Připravte si směs Hi-Di™ Formamidu a DNA Size Standard 550 (BTO) popsanou v tabulce 7, přidejte jednu nebo dvě reakce navíc pro kompenzaci chyb pipetování.

Tabulka 7. Složení denaturační směsi

Součásti	Objem na reakci
Hi-Di™ formamid	12,0 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µL

Pipetujte 12 µL denaturované směsi formamidu a DNA Size Standard 550 (BTO) do příslušného počtu jamek na PCR destičce (vhodné pro použití v genetickém analyzátoru). Pak přidejte buď 1 µL PCR produktu nebo 1 µL alelického markeru (Allelic Ladder) Mentype® **Chimera**® na jamku. PCR destičku utěsněte vhodnou fólií, vortexujte a krátce odstřed'te.

Upozornění: Alelický marker se používá ke správné identifikaci fragmentů hodnocených během analýzy dat. V každém běhu fragmentační analýzy musí být alelický marker analyzován alespoň jednou, aby byla zajištěna úspěšná analýza dat.

Upozornění: Kapiláry přístroje pro gelovou elektroforézu by neměly běžet nasucho. Pokud se vzorky nenacházejí ve všech pozicích kapilár, doplňte další jamky destičky 12 µL Hi-Di™ formamidem podle čísla kapiláry.

Připravené PCR produkty denaturujte v PCR cykléru po dobu 3 minut při 95 °C, poté ochlad'te v cykléru na 4 °C. Vzorky krátce před fragmentační analýzou odstřed'te.

3.2 Analýza délky fragmentu (fragmentační analýza)

Obecné pokyny pro analyzátor, přípravu matrice a použití softwaru GeneMapper™ naleznete v příslušném průvodci *ABI PRISM® Uživatelská příručka pro genetický analyzátor*.

Po úspěšném dokončení spektrální kalibrace přístroje pro kapilární gelovou elektroforézu se standardem Matrix BT5 (Biotype GmbH) vytvořte specifický „run modul“ (ABI 310, ABI 3130) nebo „instrument protokol“ (ABI 3500) s následujícími parametry:

Tabulka 8. Specifické parametry pro run module, nebo instrument protokol přístroje pro kapilární gelovou elektroforézu, Mentype® Chimera®

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

Na rozdíl od hodnot uvedených v tabulce 8 lze „run time“ upravit tak, aby se analyzovaly všechny fragmenty (60-550 bp) velikostního standardu 550.

Upozornění: Při nastavování specifických parametrů analýzy postupujte podle pokynů výrobce přístroje na kapilární gelovou elektroforézu.

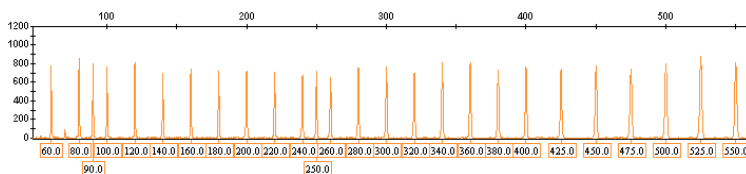
Upozornění: Vezměte na vědomí také další informace o kalibraci a aplikaci produktů Mentype® na kapilární gelové elektroforéze. Jsou k dispozici na vyžádání na adrese support@biotype.de od Biotype GmbH.

4. Vyhodnocení

Obecné pokyny pro automatické vyhodnocení naleznete v příslušné příručce *GeneMapper® Uživatelská příručka k softwaru ID / ID-X*.

Poznámka: Při hodnocení Mentype® **Chimera**® by měl být skrytý červený panel.

Stanovení přesných délek amplifikovaných produktů závisí na typu zařízení, na podmínkách elektroforézy a na použitém DNA velikostním standardu. Z důvodu komplexnosti některých STR lokusů by k určení délky mělo být použito co nejvíce rovnoměrně rozložených referenčních fragmentů. K tomu používáte velikostní DNA standard 550 (BTO) s délkami fragmentů **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 a 550 bp**.



Obr. 1 Elektroferogram velikostního DNA standardu 550 (BTO), délky fragmentů v bp

Poznámka: Pro vyhodnocení a analýzu Mentype® **Chimera**® se standardem 550 (BTO), pomocí softwaru GeneMapper® ID/ID-X, může být použit templátový soubor SST-BTO_60-500 bp.

4.1 Biotype® templátové soubory

Identifikace alel (genotypizace) by měla být provedena s pomocí vhodného vyhodnocovacího softwaru, například se softwarem GeneMapper® ID/ID-X nebo Genotyper, v kombinaci s templátovými soubory Mentype® **Chimera**®. Templátové soubory Biotype® najdete ke stažení na naší domovské stránce (www.biotype.de). Na požádání vám rádi zašleme CD-ROM.

Doporučené templátové soubory Biotype® pro software GeneMapper® ID/ID-X jsou:

Panels	Chimera_Panels_v1/v1X*#	nebo vyšší verze
BinSets	Chimera_Bins_v1/v1X*#	nebo vyšší verze
Size Standard	SST-BTO_60-500bp	
Analysis Method	Analysis_HID_310 Analysis_HID_3130 Analysis_HID_310_50rfu Analysis_HID_3130_50rfu	
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 Alleles Table for 10 Alleles	

#Kvůli nové pozitivní kontrole musí být Panel a Souprava nádob **v2** použity pro vyhodnocení dat z čísla šarže soupravy **LEUK01071**.

Panely a BinSety musí být použity vždy, další templátové soubory jsou volitelné.

Další templátové soubory Biotype® pro software GeneMapper® ID-X:

Stutter* Chimera_Stutter_v1X# nebo vyšší verze

* Při načítání výše uvedených panelů nejsou nastavení shutterů akceptována, proto musí být soubor shutteru importován navíc.

Důležité upozornění: Import a identifikace alel s pomocí nabízených templátových souborů lze zaručit pouze v případě použití software GeneMapper® ID/ID-X ID: Při použití software GeneMapper® mohou být zaznamenány problémy s importem některých templátových souborů. V tom případě byste měli upravit panely a bin sety u jednoho nebo více běhů s alelickým markerem. V případě potřeby se obraťte na naši podporu pro pomoc (support@biotype.de).

Obecný postup pro vyhodnocování

1. Zkontrolujte DNA velikostní standard
2. Zkontrolujte alelický marker (Allelic Ladder)
3. Zkontrolujte pozitivní kontrolu
4. Zkontrolujte negativní kontrolu
5. Vyhodnoťte data vzorků

4.2 Kontroly

Kontrolní DNA XY5 do LEUK01070 nebo XY1726 od LEUK01071 která je součástí kitu Mentype® **Chimera**® a další komerčně dostupné DNA reprezentují následující alely:

Tabulka 9. Alely identifikovány s s Mentype® **Chimera**®

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

Tabulka ukazuje alely referenčních DNA dostupných od ATCC a Coriell Cell Repositories, v uvedeném pořadí. Tímto jsou splněny požadavky Szibora a kol. (2003).

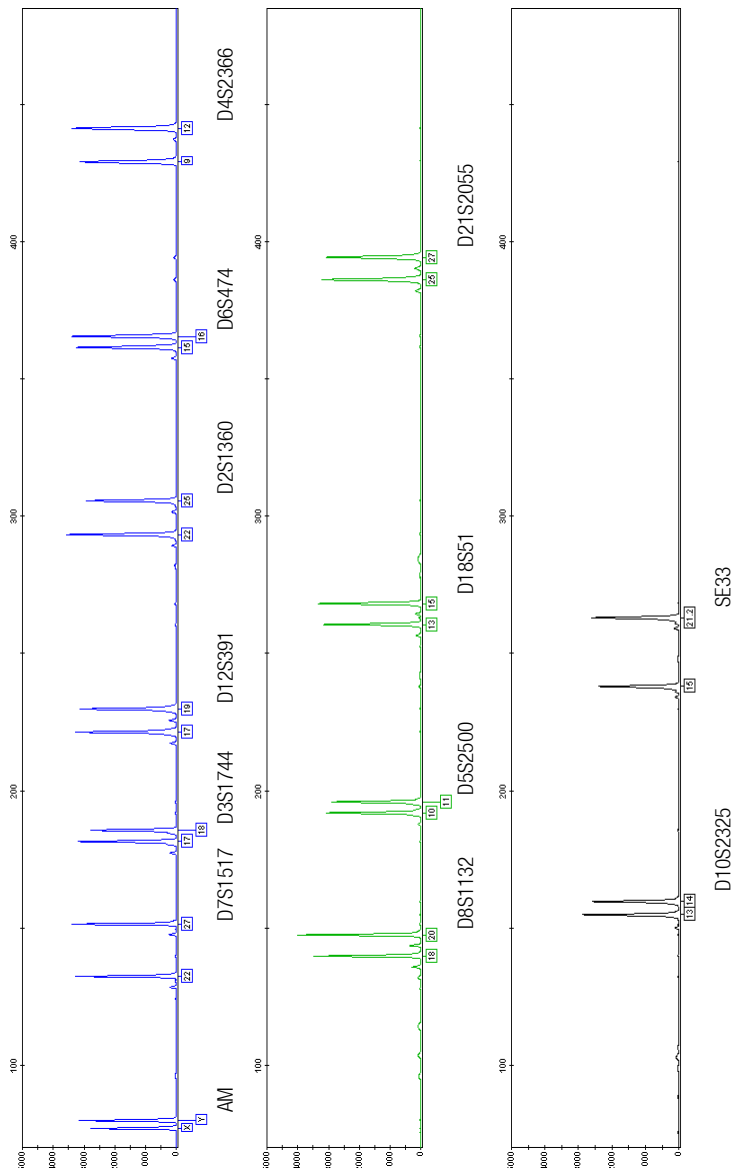
4.3 Délky fragmentů a alely

Hodnoty délky fragmentů jednotlivých alel jsou uvedeny v Tabulce 10 až 12. Všechny analýzy byly provedeny na analyzátoru ABI PRISM® 3130 s polymerem POP-4® a velikostním standardem DNA 550 (BTO). Při použití jiných analyzátorů, DNA velikostních standardů nebo polymerů, se mohou délky fragmentů lišit. Vzhledem k rozdílům specifickým pro zařízení se doporučuje individuální nastavení použitého zařízení (jemné doladění) po změření délky fragmentů. Kromě toho by mělo být provedeno vizuální srovnání s alelickým markerem.

Rozsah

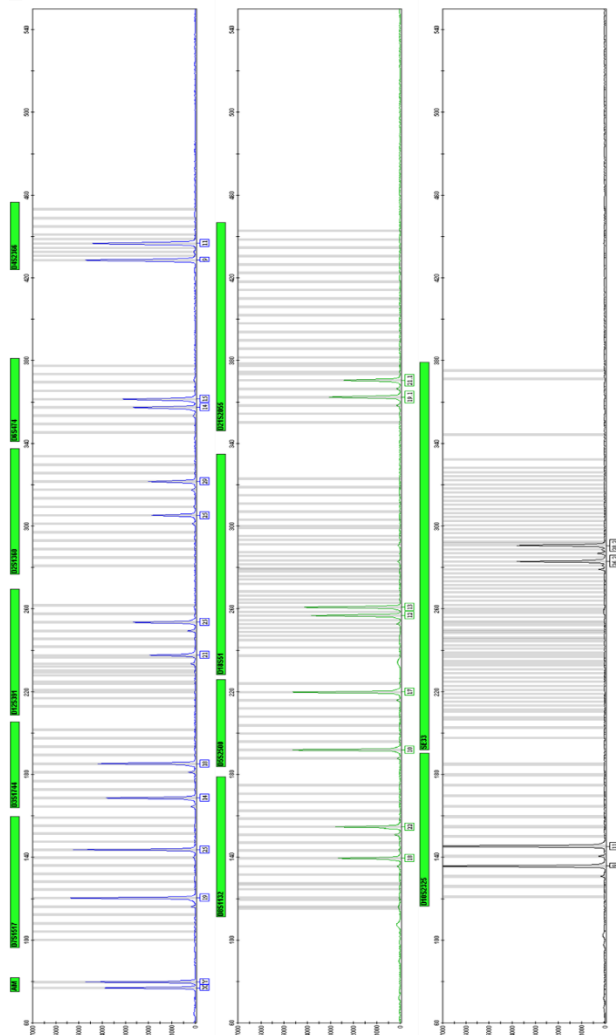
Horizontálně: 70-480 bp
Vertikálně: podle intenzity signálu vzorků

Obrázek 2A



Obr. 2 Elektroferogram Mentype® Chimera® pomocí 500 pg kontrolní (A) DNA XY1726 nebo (B) DNA XY1726. Analýza byla provedena na genetickém analyzátoru ABI PRISM® 3130 s DNA Size standardem 550 (BTO). Přiřazení alely bylo provedeno pomocí softwaru GeneMapper® ID a souboru šablony Mentype® Chimera®.

Obrázek 2B



Tabulka 10. Délky fragmentů alelického markeru Mentype® **Chimera**® měřené na genetickém analyzátoru ABI PRISM® 3130 s POP-4® polymerem (modrý panel)

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

Tabulka 11. Délky fragmentů alelického markeru Mentype® **Chimera**® měřené na genetickém analyzátoru ABI PRISM® 3130 s POP-4® polymerem (zelený panel)

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

Tabulka 12. Délky fragmentů alelického markeru Mentype® **Chimera**® měřené na genetickém analyzátoru ABI PRISM® 3130 s POP-4® polymerem (žlutý panel)

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

* zaokrouhleno na celá čísla

** Tyto „off-ladder“ alely Biotype DNA Pool jsou spojeny se současnými soubory šablony Biotype® pro software GeneMapper® ID (ID-X). Další alely viz kromě jiného na adrese http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm

† Tyto alely jsou zvýrazněny pro lepší orientaci v alelickém markeru.

5. Interpretace výsledků

Výše popsané vyhodnocení s automatickým přiřazením alel zajišťuje přesnou a spolehlivou diferenciaci alel.

Výpočet obsahu dárcovské DNA může být proveden přímo z prvotních dat analýzy fragmentů.

Pro porovnání výsledků získaných s Mentype® **Chimera**® s cytologickými výsledky (analýza Fish) musí být při cytologickém vyšetření použito alespoň 500 leukocytů.

„Pull-up Peaks“

„Pull-up Peaks se mohou vyskytovat v případech, kdy je pro analýzu použita nevhodná matrice nebo pokud jsou výšky píků mimo lineární detekční rozsah přístroje. Objevují se ve stejné poloze jako specifické vrcholy, ale v jiných barevných panelech (obvykle s nižší intenzitou signálu).

„Stutter Peaks“

Výskyt „Stutter Peaks“ závisí na složení repetitivní sekvence a na počtu alel. U tetranukleotidových STR motivů vedou chyby v Taq DNA polymeráze během PCR k píkům n-4, tj. pík je o 4 báze menší než skutečná alela. Repetitivní nukleotidy v rámci STR jsou při PCR „přeskočeny“. Pro vyhodnocení píků platí specifikace templátového souboru pro software GeneMapper™ ID/ID-X.

Přidání nukleotidů nezávislé na templátu

Multi Taq DNA polymeráza má kvůli své terminální transferázové aktivitě tendenci vázat adenosin na 3'-konec amplifikovaného DNA fragmentu. Pokud systém PCR nemá dostatek času na prodloužení nebo pokud sekvence primerů nezajistí prodloužení, toto připojení nenastane. Tento artefakt je identifikovatelný na základě výskytu fragmentu zkráceného o bázi (-1 bp pík), ve srovnání s očekávaným fragmentem. Všechny primery Biotype® jsou navrženy tak, aby minimalizovaly tvorbu artefaktu. Navíc je tvorba artefaktu omezena závěrečným extenzním krokem v protokolu PCR (68 °C po dobu 60 min.). Výška píků artefaktu se zvyšuje při vysokých kvantitách DNA. Pro vyhodnocení píků by si každá analytická laboratoř měla stanovit své vlastní limity.

Artefakty

Teplota v místnosti může výrazně ovlivnit chování PCR produktů na kapilární elektroforéze a může vést k výskytu „shoulder peaks“ nebo dvojíých, rozdělených píků. Kromě toho může být ovlivněna automatická identifikace alel. Pokud jsou pozorovány tyto jevy, doporučujeme novou injekci vzorků při vyšší teplotě místnosti a případně použití více než jednoho alelického markeru na run.

Vliv typu polymeru

Kit Mentype® **Chimera**® byl validován a certifikován na použití polymeru POP-4®. Použití jiného polymeru (např. POP-7 nebo POP-6) může ovlivnit chování specifických produktů PCR. Kromě toho může být pozorován zvýšený šum pozadí v důsledku pozměněného chování volných zbytků fluorescenčního barviva.

6. Populačně-genetická data

Nejdůležitější populačně-genetická data pro každý marker STR jsou uvedeny v tabulkách 13-16 níže. Vzorec pro výpočet Polymorfního Informačního obsahu (PIC) byl publikován Botsteinem et al. (1980), **Očekávaná heterozygotnost** (HET) Neiem a Roychoudhuryem et al. (1974), Síla diskriminace (PD) { Jonesem et al. (1972). Všechny vzorce jsou vhodné pro autozomální markery.

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

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

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

Tabulka 13. Populačně-genetická data populace

Marker D2S1360		Marker D3S1744		Marker D4S2366	
Alela	Frekvence alely	Alela	Frekvence alely	Alela	Frekvence alely
19	0.007	13	0.007	9	0.347
20	0.126	14	0.104	10	0.179
21	0.060	15	0.053	11	0.074
22	0.309	16	0.100	12	0.147
23	0.142	17	0.319	13	0.168
24	0.098	18	0.197	14	0.074
25	0.086	19	0.130	15	0.011
26	0.093	20	0.067		
27	0.035	21	0.023		
28	0.023				
29	0.012	PIC	0.790	PIC	0.760
30	0.002	PD	0.943	PD	0.919
31	0.005	HET	0.792	HET	0.795
32	0.002				
PIC	0.820				
PD	0.955				
HET	0.856				

Tabulka 14. Populačně-genetická data

Marker D5S2500		Marker D6S474		Marker D7S1517	
Alela	Frekvence alely	Alela	Frekvence alely	Alela	Frekvence alely
9	0.007	13	0.246	16	0.007
10	0.084	14	0.212	17	0.007
11	0.313	15	0.154	18	0.049
12	0.161	16	0.285	19	0.120
13	0.061	17	0.097	20	0.101
14	0.042	18	0.005	21	0.099
15	0.213			22	0.082
16	0.103	PIC	0.740	23	0.077
17	0.009	PD	0.918	24	0.155
18	0.007	HET	0.733	25	0.230
				26	0.054
PIC	0.780			27	0.014
PD	0.938			28	0.005
HET	0.804				
				PIC	0.860
				PD	0.967
				HET	0.826

Tabulka 15. Populačně-genetická data

Marker D8S1132		Marker D10S2325		Marker D12S391	
Alela	Frekvence alely	Alela	Frekvence alely	Alela	Frekvence alely
16	0.007	6	0.002	15	0.035
17	0.095	7	0.102	16	0.019
18	0.221	8	0.056	17	0.107
19	0.153	9	0.121	17.3	0.019
20	0.128	10	0.142	18	0.215
21	0.119	11	0.144	18.3	0.007
22	0.133	12	0.193	19	0.121
23	0.077	13	0.133	19.3	0.016
24	0.056	14	0.065	20	0.117
25	0.005	15	0.037	21	0.093
26	0.005	16	0.005	22	0.114
27	0.002			23	0.072
		PIC	0.860	24	0.040
PIC	0.850	PD	0.967	25	0.021
PD	0.964	HET	0.851	26	0.002
HET	0.828				
				PIC	0.870
				PD	0.971
				HET	0.893

Tabulka 16. Populačně-genetická data

Marker D18S51		Marker D21S2055		Marker SE33 (ACTBP2)	
Alela	Frekvence alely	Alela	Frekvence alely	Alela	Frekvence alely
10	0.005	16.1	0.056	11	0.002
12	0.103	17.1	0.021	12	0.014
13	0.110	18.1	0.023	13	0.002
14	0.157	19.1	0.274	13.2	0.002
15	0.199	20.1	0.040	14	0.026
16	0.161	21.1	0.019	15	0.049
17	0.112	22.1	0.005	16	0.047
18	0.072	23	0.007	17	0.070
19	0.028	25	0.112	17.3	0.002
20	0.030	26	0.116	18	0.044
21	0.021	27	0.016	18.3	0.002
24	0.002	28	0.007	19	0.082
		29	0.030	19.2	0.009
PIC	0.850	30	0.021	20	0.044
PD	0.964	31	0.023	20.2	0.009
HET	0.902	32	0.026	21	0.035
		33	0.067	21.2	0.019
		34	0.074	22	0.007
		35	0.053	22.2	0.035
		36	0.007	23.2	0.023
		37	0.002	24	0.002
				24.2	0.035
		PIC	0.870	25.2	0.044
		PD	0.971	26.2	0.040
		HET	0.856	27.2	0.084
				28.2	0.084
				29.2	0.051
				30	0.002
				30.2	0.061
				31.2	0.028
				32.2	0.023
				33	0.009
				33.2	0.005
				34	0.002
				36	0.002
				PIC	0.950
				PD	0.990
				HET	0.949

Všechna populační genetická data jsou založena na studii provedené společností Biotype GmbH na přibližně 210 nepříbuzných Evropanech.

7. Reference

Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayr W, Olaisen B (1997) DNA Recommendations. Further report of the DNA commission of the ISFG regarding the use of short tandem repeat systems. *Int J Legal Med* 110:175-176.

Becker D, Vogelsang D, Brabetz W (2007) Population data on the seven short tandem repeat loci D4S2366, D6S474, D14S608, D19S246, D20S480, D21S226 and D22S689 in a German population. *Int J Legal Med* 121:78-81.

Botstein D, White RI, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331.

Hering S, Müller E (2001) New allele and mutational events in D12S391 and D8S1132: sequence data from an eastern German population. *Forensic Sci Int* 124:187-191.

Jones DA (1972) Blood samples: Probability of Discrimination. *J Forensic Sci Soc* 12:355-359.

Nei M, Roychoudhury AK (1974) Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76:379–390.

Szibor R, Edelmann J, Hering S, Plate I, Wittig H, Roewer L, Wiegand P, Cali F, Romano V, Michael M (2003) Cell line DNA typing in forensic genetics – the necessity of reliable standards. *Forensic Sci Int* 138 37-43.

Wiegand P, Lareu M. V., Schürenkamp M (1999) D18S535, D1S1656 and D10S2325: three efficient short tandem repeats for forensic genetics. *Int J Legal Med* 112:360-363.

Wiegand P, Klintschar M (2002) Population genetic data, comparison of the repeat structure and mutation events of two short STRs. *Int J Legal Med* 116:258-261.

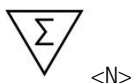
8. Vysvětlení symbolů



Výrobce



Označení šarže



Dostatečné pro testy <N>



Odkaz na eIFU



Lze použít do



Omezení teploty



Objednací číslo



Diagnostika in vitro



Chraňte před světlem



Udržujte v suchu

Specifikace kitu Mentype® Chimera

A Analytická validace

A a) Stanovení standardní reakce a tolerance specifické pro šarže

Cíl: Stanovení standardní reakce a tolerancí specifických pro šarže vzhledem k relativním výškám signálu (RFU), vyváženosti výšek signálu multiplexní PCR a základní linie.

Metodika: Testovací souprava je dodávána s kontrolní DNA, která je ve většině systémů STR heterozygotní. Standardní reakce byla prováděna s kontrolní DNA v nominální koncentraci 500 pg v tetraplikátech. Byly také přidány čtyři slepé kontroly bez templátové DNA (NTC).

Výsledek: Pro smíchání PCR primerů z různých šarží byly stanoveny tyto specifikace: Při použití *genetického analyzátoru ABI PRISM® 310* dosahovaly signály hodnot 1 000–4 000 RFU a při použití *genetického analyzátoru ABI PRISM® 3130* byly výšky signálu v rozmezí 1 000–5 000 RFU. Kolísání výšky signálů heterozygotních systémů by nemělo překročit 30 % směrné hodnoty. Nebyly nalezeny žádné nespecifické signály ≥ 50 RFU pro slepé vzorky.

A b) Testování přesnosti genotypování

Cíl: Přesnost identifikace alel je statisticky ověřena za standardních podmínek. Test ověřuje shodu výsledků u předem ogenotypovaných vzorků mezi automatickou identifikací alel s pomocí alelického ladderu a přiřazením alel s pomocí jiných metod (jiné sady PCR, přímé sekvencování atd.) při využití softwaru GeneMapper ID. Na základě výsledků bylo určeno nastavení přístroje pro daný test genotypizace kapilární gelovou elektroforézou (Bins a Panels), a byl stanoven podíl „stutter“ píků pro vyhodnocovací templáty DNA sekvenceru.

Metodika: 80 předem ogenotypovaných lidských DNA z různých zdrojů (plnohodnotná krev, tvářové stěry) bylo otestováno v samostatných nezávislých reakcích. Kromě toho byla testována negativní kontrola (vzorek bez DNA). Jako akceptační kritérium byly definovány úplné profily píků s výškou ≥ 50 RFU (ruční vyhodnocení).

Výsledek: Po determinaci nastavení přístroje v daném testu byl všem vzorkům DNA byl přiřazen správný genotyp pro všechny systémy SRT i pro amelogeninový marker.

A c) Testování analytické specifičnosti

Cíl: Studie byla navržena tak, aby vyloučila falešně pozitivní výsledky z důvodu zkřížené reaktivity s vybranými vzorky DNA jiného než lidského původu. V klinické praxi však může být nehumánní DNA z důvodu sterilního vzorkování do značné míry vyloučena.

Metodika: Bylo testováno 2,5 ng genomické DNA z *Bos taurus* (skot), *Sus scrofa domestica* (domácí prasata), *Canis lupus familiaris* (pes), *Felis catus* (kočka) a *Oryctolagus cuniculus* (domácí králík). DNA ze zvířat pocházela ze vzorků krve, které byly poskytnuty jako zbytek veterinárního vyšetřování.

Výsledky: V oblasti alel (< 200 RFU) nebyla nalezena žádná zkřížená reaktivita.

A d) Testování analytické senzitivity

Cíl: Test byl použit k určení limitu analytické detekce (citlivosti).

Metodika: Ředící řada byla testována s 500 pg až 31,5 pg referenční DNA v tetraplikátech. Kritéria akceptace byla definována jako úplné profily DNA s ≥ 200 RFU.

Výsledky: Byl stanoven detekční limit 200 pg genomické DNA.

A e) Testování různých PCR termocyklérů

Cíl: PCR Termocykléry různých výrobců se liší svými specifikacemi. Zejména mohou existovat různé rychlosti zahřívání a chlazení, jakož i různé techniky regulace teploty.

Metodika: Testování standardních reakcí pomocí kontrolní DNA ve jmenovité koncentraci 500 ng byla provedena těmito termocykléry v tetraplikátech se stejným master mixem a 2 vzorky NTC bez DNA: Thermocycler *GeneAmp 9700* s hliníkovým blokem (Life Technologies, Applied Biosystems Division Germany GmbH, Darmstadt) navíc zařízení *GeneAmp 9700* se stříbrným blokem (Applied Biosystems Germany GmbH, Darmstadt), DNA Engine (PTC-200) termální cyklér Peltier (Bio-Rad Laboratories GmbH, Mnichov), *Biometra T1* (Biometra GmbH, Göttingen), *termální cyklér Techne® TC-512* (biostep GmbH, Jahnsdorf) a *Eppendorf Mastercycler ep-S* (Eppendorf AG, Hamburk).

Výsledky: Nebyly detekovány žádné nespecifické produkty ≥ 200 RFU. Odchyłka průměrných výšek píku ve srovnání se standardní reakcí byla 20 % při definovaném rampingu 2 °C/s, maximálně 20 %.

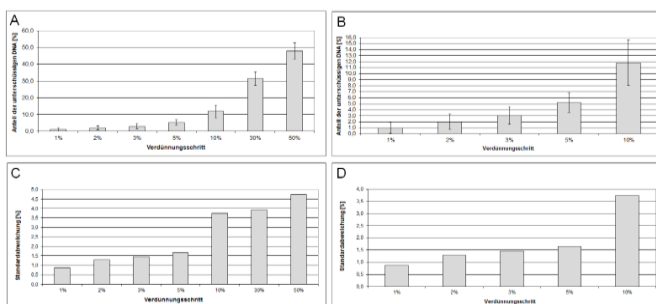
A f) Testování různých směsných vzorků DNA

Cíl: Cílem analýzy chimerismu po alogenní transplantaci kmenových buněk krve je detekce a relativní kvantifikace fragmentů DNA dárce a recipienta. K detekci

minimálního zbytkového onemocnění by mělo být ve smíšeném vzorku detekováno nejnižší možné množství DNA dárce nebo recipienta.

Metodika: Byly připraveny tři nezávislé směsi dvou DNA, přičemž deficitní DNA byla použita při 0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 %. DNA ve směsích vykazovaly alespoň 3 lokusy STR se čtyřmi informativními alelami. V každém případě bylo testováno 1 ng směsi DNA při standardním reakčním profilu, ve čtyřech paralelních reakcích. Byly hodnoceny signály s výškou min. 50 RFU.

Výsledky: Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 4. Pro deficitní DNA bylo možné dosáhnout detekčního limitu 1 %. To odpovídá hodnotám 1-5 % dosaženým s forenzními STR soupravami používanými při analýze chimérismu.



Obr. 4: Testování směsí DNA. (A, B) Průměrné hodnoty a směrodatná odchylka frakcí deficitní DNA vypočtená ze signálních hladin elektroforézy kapilárního gelu. (C, D) směrodatné odchylky od A a B.

A g) Testování vlivu různých teplot annealingu v PCR

Cíl: Pro určení robustnosti PCR je simulováno kolísání teploty pro krok hybridizace primerů (annealing) v multiplexní PCR. Tento teplotní krok je kritický pro citlivost a specifitost PCR.

Metodika: Specifická teplota annealingu 60 °C v standardní reakci s kontrolní DNA ve jmenovité koncentraci 500 pg byla změněna o ± 1 °C a ± 2 °C. Byla provedena trojnásobná analýza se stejným master mixem.

Výsledky: Nebyly nalezeny žádné nespecifické vedlejší produkty ≥ 200 RFU pro ± 1 °C. Průměrné výšky piku se lišily maximálně o ± 30 % od standardní reakce při ± 1 °C. Pro ± 2 °C nebyla detekována žádná ztráta alelického signálu < 200 RFU.

A h) Testování různých šarží PCR pufrů

Cíl: Poměry koncentrací mezi komponenty obsaženými v PCR pufru reakční směsi A (dNTP, koncentrace iontů, zejména Mg^{2+}) jsou kritické pro citlivost, specifitost a rovnováhu signálů v multiplexní PCR. Robustnost testu je proto testována vůči různým šaržím dodávaného PCR pufru.

Metodika: Test 3 nezávislých šarží reakční směsi A byl proveden při standardní reakci s kontrolní DNA o nominální koncentraci 500 pg.

Výsledek: Nebyly detekovány žádné nespecifické vedlejší produkty ≥ 50 RFU. Odchylka průměrných výšek píku ve srovnání se standardní reakcí byla nejvýše 20 %.

A i) Testování inhibitorů PCR

Cíl: Hematin z hemoglobinu je silným inhibitorem *Taq* DNA polymerázy, pokud není kompletně odstraněn při purifikaci DNA z plné krve.

Metodika: Účinek *Hematin porcine* (Sigma-Aldrich, Freiburg) byl měřen v konečných koncentracích 0-250 μM ve standardní reakci s kontrolní DNA o nominální koncentraci 500 pg.

Výsledek: Bylo dosaženo úplných profilů (≥ 50 RFU) až do koncentrace inhibitoru 100 μM *Hematin porcine*. Pro konečnou koncentraci 150 μM již nebylo možné dosáhnout úplných profilů (pouze částečné profily).

A j) Stabilita po otevření

Cíl: Byla testována stabilita reagentů sady PCR po opakovaném zmrazení a rozmrazení.

Metodika: Reagencie kitu byly podrobeny cyklu dvacetinásobného zmrazení a rozmrazení. Zmrazení bylo provedeno po dobu minimálně 1 hod. při -20 °C. Rozmrazování bylo provedeno při teplotě místnosti a reagentie byla před použitím homogenizována protřepáním. Poté byla provedena standardní reakce s kontrolní DNA jmenovité koncentrace 500 pg a doplňujícími slepými vzorky bez DNA v triplicáttech. Výsledky byly porovnány se standardní reakcí bez cyklu zmrazení a rozmrazení.

Výsledek: Odchylka zjištěných výšek piků v porovnání se standardní reakcí činila maximálně 20 % (zejména ztráta signálu). U slepých vzorků nebyly zjištěny žádné dodatečné píky > 50 RFU v rámci rozsahu měřítka.

B **Zhodnocení klinických parametrů testu****B a)** **Odběr vzorků, etická a regulační hlediska**

Byla provedena klinická studie hodnocení výkonu kitu podle § 20 až § 24 zákona o lékařských výrobcích (DE). Zproštění schvalovací povinnosti pro lékařské výrobky s nízkým bezpečnostním rizikem podle § 7 nařízení o klinických zkouškách lékařských výrobků bylo uděleno Spolkovým ústavem pro léčiva a lékařské výrobky. K dispozici bylo kladné hlasování příslušné etické komise a prohlášení o souhlasu pacienta.

Byla použita heparinizovaná žilní plnohodnotná krev.

B b) **Referenční metody**

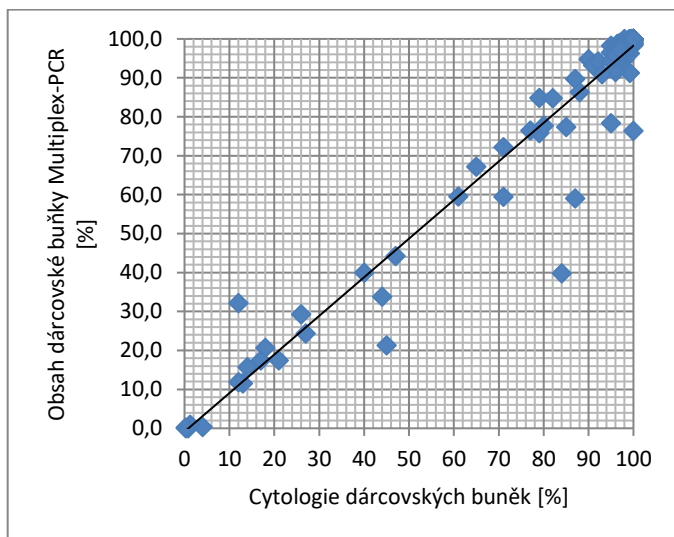
Jako srovnávací test sloužila cytogenetická diference dárcovských a recipientních leukocytů pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Sériová chromozomová specifická CE-IVD CEP® X Spectrum Orange™ / Y Spectrum Green™ přímo značená fluorescenční DNA sonda (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, DE) byla použita podle pokynů výrobce.

B c) **Extrakce DNA a přečištění**

Extrakce DNA z heparinizované plné krve byla provedena pomocí soupravy QIAamp® DNA Blood Mini (Qiagen GmbH, Hilden, DE) podle pokynů výrobce.

B d) **Výsledky**

V různých dnech po transplantaci alogenních kmenových buněk krve nebo kostní dřeně bylo shromážděno celkem 103 datových souborů dospělých pacientů. Dvojice dárce-recipient se lišily v genetickém pohlaví a byly tedy vhodné pro FISH specifický pro pohlavní chromozomy. Na PCR bylo použito alespoň 1,5 ng genomické DNA. Nejprve byly identifikovány všechny informační systémy STR párů dárce-recipient a pohlaví bylo potvrzeno genotypizací amelogeninového markeru, který je součástí multiplexních PCR. Pro výsledky PCR byly použity střední hodnoty hladin signálu všech informativních STR (nejméně 2). Výsledky srovnávacích testů jsou shrnuty na Obr. 5.



Obr. 5: Konkordanční analýza multiplexní PCR ve srovnání s cytologií.

V 92 ze 103 sad měření (90,3 %) byl rozdíl ve zjištění multiplexní PCR z cytogenetiky menší než 5 %. Větší odchylky byly pozorovány pouze u cytogenetických nálezů, u nichž byl celkový počet buněk 500 nebo méně. Podle doporučení výrobce soupravy FISH by se mělo spočítat nejméně 200 buněk. Podle praktických doporučení však vyšší absolutní počet buněk (500–1 000) dává lepší cytogenetické výsledky [1, 2].

B e) Reference

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

Biotype GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 Dresden

Tel. +49 351 8838 400

Fax +49 351 8838 403

info@biotype.de

www.biotype.de