

Mentype[®] DIPscreen

Návod k použití

První krok ke kvalifikaci vzorků chimérismu

Diagnostika in vitro



DISIFU01v2cz

Duben 2021

45-45410-0025

45-45410-0100

45-45410-0400



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 kliniky a výzkum.

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

Popis produktu

Mentype® **DIPscreen** je multiplexní PCR aplikace pro identifikaci informativních DIP lokusů pro diferenciaci dárce / recipienta po alogenní transplantaci kmenových buněk. Screeningová reakce detekuje celkem 33 bialelických DIP lokusů společně s s lokusem amelogeninu který je specifický pro pohlaví.

Analýza molekulárního chimerismu je zásadní pro monitorování růstu transplantátu kmenových buněk nebo pro včasnou detekci hrozící odmítavé reakce. Molekulární chimérická analýza může být provedena prostřednictvím analýzy různých sekvenčních motivů DNA. Velice výhodné jsou polymorfismy tzv. inserce / delece DNA (DIPs/INDEL). Ve srovnání s jinými typy DNA markerů nevede PCR amplifikace těchto DIP-markerů k tvorbě artefaktů „shutter-peaks“, které mohou komplikovat vyhodnocení analýzy. Navíc, DIP polymorfismy jsou nejvhodnější pro kvantitativní analýzu pomocí qPCR. Diagnostika s kitem Mentype® **DIPscreen** založená na DIP markerech proto poskytuje jednoznačnou diferenciaci donora a recipienta a umožňuje efektivní kvantitativní a spolehlivé sledování stavu chimérismu.

33 DIP lokusů testovaných Mentype® **DIPscreen** je distribuovaných na 18 chromozomech, lokusy jsou od sebe vzdáleny alespoň 10 Mbp (Tabulka 1). Detekční limit Mentype® **DIPscreen** je **200 pg genomické DNA**. Optimální rozsah použité DNA pro analýzu za standardních podmínek je 1,0 a 2,0 ng DNA. Primery jsou značeny fluorescenčními barvivy **6-FAM, BTG a BTY**.

Validace a vyhodnocení testu bylo provedeno na GeneAmp® 9700 Silber (max. režim), Eppendorf Mastercycler ep-S, Biometra T1, ABI PRISM® 3130 genetickém analyzátoru s použitím 36 cm kapilár a polymeru POP4®.

Obsah

1. Popis Mentype® DIPscreen.....	5
2. PCR amplifikace.....	9
2.1 Příprava master mixu	9
2.2 Parametry PCR amplifikace.....	10
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	14
4.2 Kontroly	15
4.3 Délky fragmentů a alely.....	16
5. Interpretace výsledků	21
6. Reference	22
7. Vysvětlení symbolů	23
A Analytická validace	24
A a) Stanovení standardní reakce a tolerancí specifických pro šarže	24
A b) Testování přesnosti genotypování	24
A c) Testování analytické specifičnosti.....	25
A d) Testování analytické senzitivity	25
A e) Testování různých PCR termocyklerů	25
A f) Testování různých směsných vzorků DNA	26
A g) Testování vlivu různých teplot annealingu v PCR	26
A h) Testování různých šarží PCR pufrů.....	26
A i) Testování krátkodobé stability	27
B Zhodnocení klinických parametrů testu	27
B a) Odběr vzorků, etická a regulační hlediska	27
B b) Referenční metody	27
B c) Extrakce DNA a přečištění.....	27
B d) Výsledky	28
B e) Reference.....	30

1. Popis Mentype® DIPscreen

Tabulka 1. Přehled lokusů a relevantních informací Mentype® DIPscreen

DIP Locus	Chromozomální Pozice	Motivy (-DIP / + DIP)
Panel 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	-/GGTAGTATGGGCCT
HLD163	12q24.31	-/AACTACGGCACGCC
Panel 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
Panel 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

Zkratky: HLD = DIP lidského lokusu, -DIP = delece, +DIP = inserce

Tabulka 1 ukazuje lokalizaci na chromozomech, sekvenční motiv a příslušné referenční alely DIP lokusů detekovaných pomocí DIP Mentype® DIPscreen.

Obsah

Mentype® DIPscreen

Titulek	Obsah	25 reakcí	Objem 100 reakcí	400 reakcí
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® DIPscreen PrimerMix	Směs primerů	125 µL	500 µL	4x 500 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (2,5 U/µL)	Multi Taq 2 DNA polymeráza	15 µL	60 µL	4x 60 µL
Mentype® DIPscreen Control DNA XY13 (2 ng/µL) nebo Control DNA XY82 (2 ng/µL)	Kontrolní DNA XY13 (2 ng/µL) nebo Kontrolní DNA XY82 (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® DIPscreen 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

Tabulka 2. Informace pro objednání souprav Mentype® DIPscreen

Název výrobku	Velikost balení	Objednáací číslo
Mentype® DIPscreen	25 reakcí	45-45410-0025
Mentype® DIPscreen	100 reakcí	45-45410-0100
Mentype® DIPscreen	400 reakcí	45-45410-0400

Skladování

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

Další reagentie

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

Tabulka 3. Další reagentie potřebné k provedení analýzy s kitem použití Mentype® DIPscreen

Činidlo	Dodavatel	Objednací číslo
Hi-Di™ formamid, 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

Výstrahy a bezpečnostní upozornění

VeźmĚte prosĚm na vĚdomĚnĚ bezpečnostnĚ list.

Pro komponenty kitu jsou na vyřĚdĚnĚnĚ k dispozici bezpečnostnĚ listy. OhlednĚ bezpečnostnĚch listů reagentiĚ, kterĚ nejsou součástí kitu, se obraťte na příslušnĚho vĚrobcĚ.

Do řĚarže LEUK01086 (Reaction Mix A řĚarže CH2000163)

Kit Mentype® DIPscreen obsahuje nĚsledujĚcĚ potenciĚlnĚ nebezpeĚnĚ lĚtky:

Obsah sady	ChemikĚlie	NebezpeĚĚ
Reaction Mix A	AzĚd sodnĚy NaN ₃	přĚ požitĚm toxickĚy, přĚ kontaktu s kyselinou bude vyvĚjen toxickĚy plyn

DodrřĚnĚnĚ a kontrola kvality

CelĚy obsah testovacĚ soupravy podlĚhĚ intenzivnĚ kontrole kvality spoleĚnosti Biotype GmbH. Kvalita testovacĚch souprav je přĚbĚřnĚ přĚzkoumĚvĚna, aby se prokĚzala jejich neomezenĚ pouřĚitelnost. KontaktujĚte nĚs ve vřĚch otĚzkĚch ohlednĚ doodrřĚnĚnĚ a kontroly kvality.

OchrannĚ znĚmky a patenty

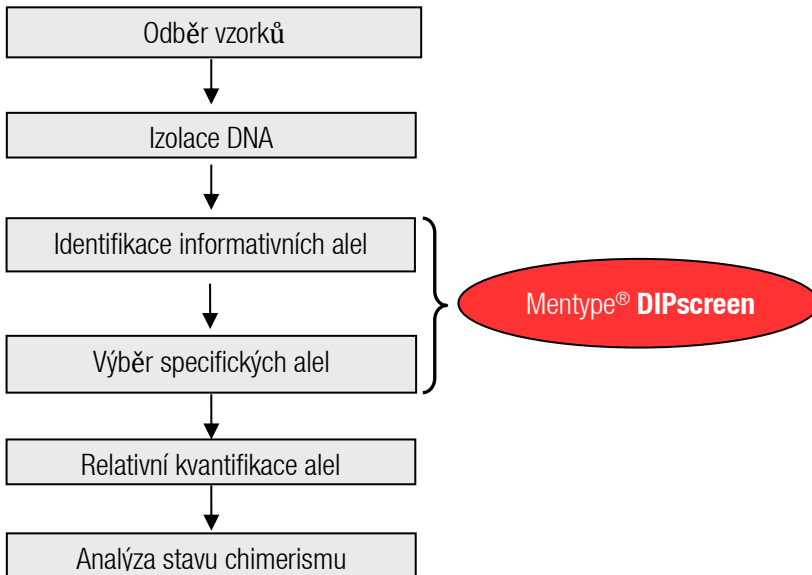
Mentype® je registrovanĚ ochrannĚ znĚmka spoleĚnosti Biotype GmbH.

ABI PRISM®, GeneMapper®, GeneAmp® a Applied Biosystems® jsou registrovanĚ ochrannĚ znĚmky spoleĚnosti Applied Biosystems LLC.

POP4® je registrovanĚ evropskĚ ochrannĚ znĚmka spoleĚnosti Applied Biosystems LLC.

PCR je chrĚnĚno patentem. VlastnĚkem patentu je spoleĚnost Roche Molecular Systems a F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Přehled analýzy chimerismu s kitem Mentype® DIPscreen



Od vzorkování po analýzu - analýza chimerismu pomocí kitu Mentype® DIPscreen

Protokoly pro PCR amplifikaci, elektroforézu a vyhodnocení

2. PCR amplifikace

2.1 Příprava master mixu

Následující tabulka ukazuje objemy použitých PCR reagensů 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 PCR Master Mix Mentype® DIPscreen

Komponenty	Objem
Nuclease-Free Water	13,4 μL
Reaction Mix A*	5,0 μL
Mentype® DIPscreen PrimerMix	5,0 μL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (2,5 U/ μL)	0,6 μL
Celkový objem hlavní směsi	24,0 μL
Použití templátové DNA nebo kontrol	1,0 μL

* obsahuje Mg^{2+} , dNTPs, BSA

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

Množství použité templátové DNA závisí na její koncentraci. Pro referenční vzorky obvykle postačí 1 μL . U kritických vzorků s nízkou koncentrací DNA 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 píku v **28 PCR cyklech** s **1 ng kontrolní DNA XY13 nebo XY82** 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.

Templátová DNA

Optimální množství DNA je **1-2 ng na reakci**. V závislosti na použité kvantifikační metodě se může změřená hodnota koncentrace DNA lišit, takže může být nutné upravit optimální množství DNA.

Pozitivní kontrola

Poznámka: Od čísla šarže soupravy **LEUK01087** obsahuje souprava novou pozitivní kontrolní DNA **XY82**. Toto se liší od předchozí kontrolní DNA XY13 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 8.

Pro pozitivní kontrolu zřed'te kontrolní DNA XY13 nebo DNA XY82 na 1 ng/μL v příslušném objemu. Pipetujte zředěnou kontrolní DNA namísto zkoumané templátové 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.

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 doporučuje 28 cyklů PCR.

Standardní metoda

Doporučeno pro všechny vzorky DNA

Tabulka 5. Standardní protokol PCR amplifikace pro kit Mentype® DIPscreen

Teplota	Čas	
94 °C	4 minuty (hot start pro aktivaci DNA polymerázy Multi Taq 2)	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	28 cyklů
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	do konce

Poznámka: U PCR cyklérů s funkcí nastavitelnosti rychlosti ohřevu a chlazení upravte pro dosažení optimálních výsledků ramping na přibližně 4 až 5 °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 (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 6 přidejte jednu nebo dvě reakce navíc pro kompenzaci chyb pipetování.

Tabulka 6. 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® **DIPscreen** 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 na PCR cykléru po dobu 3 minut při 95 °C, poté ochlad'te v cykléru na 4 °C. Vzorky před fragmentační analýzou krátce 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 standardem Matrix BT5 (Biotype GmbH) vytvořte specifický „run modul“ (ABI 310, ABI 3130) nebo „instrument protokol“ (ABI 3500) s následujícími parametry:

Tabulka 7. Specifické parametry fragmentační analýzyMentype® 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

Hodnoty uvedené v tabulce 7 lze upravit tak, aby se analyzovaly všechny fragmenty (60-550 bp) velikostního standardu 550.

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

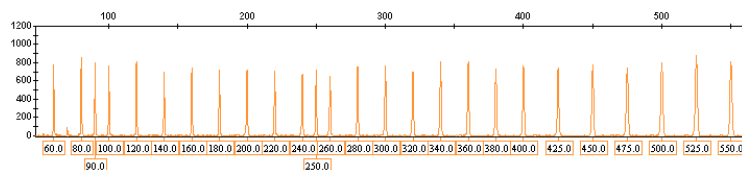
Upozornění: Vezměte na vědomí také další informace o kalibraci a aplikaci produktů Mentype® na kapilární gelové elektroforéze . Jsou k dispozici na vyžádání na adrese support@biotype.de od Biotype GmbH.

4. Vyhodnocení

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

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

Stanovení přesných délek amplifikovaných produktů závisí na typu zařízení, na podmínkách elektroforézy a na použitém DNA velikostním standardu . Pro zajištění spolehlivé analýzy by se pro stanovení délky mělo použít 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® **DIPscreen** se standardem 550 (BTO), pomocí softwaru GeneMapper® ID/ID-X, může být použit templátový soubor SST-BTO_60-450 bp.

4.1 Biotype® templátové soubory

Identifikace alel separovaných produktů PCR (genotypizace) by měla být provedena s pomocí vhodného vyhodnocovacího softwaru, např. s GeneMapper® ID/ID-X v kombinaci s templátovými soubory Mentype® **DIPscreen**.

Templátové soubory Biotype® najdete 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	DIPscreen_Panels_v0/v0X#	nebo vyšší verze
BinSets	DIPscreen_Bins_v0/v0X*	nebo vyšší verze
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	

Kvůli nově pozitivní kontrole musí být Panel a Souprava nádob v1/v1X použity pro vyhodnocení dat z čísla šarže soupravy LEUK01087.

Panely a BinSety musí být použity vždy, další templátové soubory jsou volitelné. Templátové soubory Biotype® pro software GeneMapper® ID/ID-X byly generovány pro použití polymeru POP4®. Při použití jiných typů polymerů je nutné případně provést změny panelů a BinSets a metody analýzy předtím, než jsou analyzovány údaje. Podrobné instrukce, viz naše webové stránky (www.biotype.de) jako podklady ke stažení v části Templátové soubory Biotype® GeneMapper®.

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 XY13 nebo XY82 která je součástí kitů Mentype® **DIPscreen** a další komerčně dostupné DNA reprezentují následující alely:

Tabulka 8. Alely identifikovány s Mentype® **DIPscreen**, -DIP = delece, +DIP = inzerce

Lokus	Control DNA XY82	Control DNA XY13	ATCC K-562	CCR 9947A	CCR 9948	CCR 3657
AM	XY	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	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+

Referenční DNA K-562 je dostupná od ATCC. DNA 9947A, 9948 a 3657 lze zakoupit od Coriell Cell Repositories

4.3 Délky fragmentů a alely

Hodnoty délky fragmentů jednotlivých alel jsou uvedeny v Tabulce 9. Všechny analýzy byly provedeny na analyzátoru ABI PRISM® 3130 s polymerem POP-4® a velikostním DNA standardem 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

Horizontální: 70-430 bp (viz obr. 2A, 2B a 3)

Vertikálně: podle intenzity signálu vzorků

Tabulka 9. Délka fragmentů alelického markeru Mentype® **DIPscreen**, měřeno na genetickém analyzátoru ABI PRISM® 3130 s polymerem POP4® (FAM, BTG, BTY Panel) ABI PRISM® 3130 genetický analyzátor s POP4® polymerem (FAM, BTG, BTY Panel)

Marker/FAM	-DIP [bp]*	+DIP [bp]*	Marker/BTG	-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	Marker/BTY	-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

* zaokrouhleno na celá čísla

5. Interpretace výsledků

Výše popsané vyhodnocení s automatickou identifikací alel zajišťuje přesnou a spolehlivou diferenciaci alel.

„Pull-up Peaks“

„Pull-up peaks se mohou vyskytovat v případě, 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).

Připojení nukleotidů nezávislé na templátu

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 rozpoznatelný výskytem zkráceného fragmentu s jednou bází (pík -1 bp), ve srovnání s očekávaným fragmentem. Všechny primery Biotype® jsou navrženy tak, aby minimalizovaly tvorbu artefaktu. Kromě toho je tvorba artefaktu snížena konečným krokem extenze v protokolu PCR (68 °C po dobu 60 min). Výška píku 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 dvojitých, 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® **DIPscreen** byl validován a certifikován pro použití polymeru POP4®. Použití jiného polymeru (např. POP7™ nebo POP6™) může ovlivnit chování specifických produktů PCR. Kromě toho může být pozorován zvýšený šum pozadí v důsledku pozměněného chování volných zbytků fluorescenčního barviva.

6. Reference

- 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 chimerism 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.

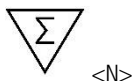
7. Vysvětlení symbolů



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 sady Mentype® DIPscreen

A Analytická validace

A a) Stanovení standardní reakce a tolerancí specifických pro šarže

Cíl: Byly stanoveny standardní reakce a tolerance specifické pro šarže s ohledem na absolutní úroveň signálu (RFU), rovnováhu signálních úrovní multiplexní PCR a baseline.

Metodika: Testovací souprava obsahuje kontrolní DNA XY13 zdravého dárce, který je heterozygotní v 17 systémech DIP a amelogeninu. Standardní reakce (28 PCR cyklů) byla prováděna s touto kontrolní DNA v nominální koncentraci 1 ng v tetraplikátech. Byly také přidány čtyři kontroly bez templátové DNA (NTC).

Výsledek: Po smíchání PCR primerů z různých šarží byly stanoveny následující specifikace: Při použití genetického analyzátoru ABI PRISM® 3130 dosahovaly signály hodnot 1 000–5 000 RFU. Kolísání výšky signálů heterozygotních systémů by nemělo překročit 50 % směrné hodnoty. Nebyly nalezeny žádné nespecifické signály < 200 RFU pro slepé vzorky.

A b) Testování přesnosti genotypování

Cíl: Přesnost identifikace alel by měla být statisticky ověřena za standardních podmínek. Test ověřil 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).

Metodika: 100 předem ogenotypovaných lidských DNA od dárců z různých zdrojů (plná 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 > 200 RFU (ruční vyhodnocení) [1; 2].

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

A c) Testování analytické specifčnosti

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 1 ng až 65 pg referenční DNA v tetraplikátech. Kritéria akceptace byla definována jako úplné profily DNA s > 100 RFU.

Výsledky: Byl stanoven detekční limit 200 pg genomické DNA.

A e) Testování různých PCR termocyklérů

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

Metodika: Standardní reakce se stejným master mixem a s kontrolní DNA v koncentraci 1 ng byla provedena v tetraplikátech se všemi termocykléry popsány v oddíle 1.1. Kromě toho byly zkoumány 2 vzorky NTC bez DNA.

Výsledky: Nebyly detekovány žádné nespecifické vedlejší produkty > 200 RFU.

Odchytky 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 samostatná detekce a relativní kvantifikace DNA dárce a recipienta. Pro detekci minimálního zbytkového onemocnění by mělo být možné detekovat co nejmenší množství recipientní DNA ve směsi. Při analytické validaci byly proto připraveny různé směsi dvou definovaných DNA s různými genotypy.

Metodika: Bylo připraveno 10 nezávislých směsí každé ze dvou nepřibuzných DNA, s deficitní DNA v 0 %, 1 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 % a 70 % roztoku. Mezi dvěma DNA ve směsích bylo pro vyhodnocení použito průměrně 13 DIP lokusů ($12,8 \pm 2,22$) s informativními alely. Ve všech případech byly testovány 2 ng směsi DNA (viz kapitola c) ve standardním reakčním profilu. Byly hodnoceny signály s nejméně 50 RFU.

Výsledky: Pro deficitní DNA bylo možné dosáhnout detekčního limitu 1 %. To odpovídá hodnotám 1–5 % dosaženým s forenzními soupravami STR používanými při analýze chimerismu [3-6].

A g) Testování vlivu různých teplot annealingu v PCR

Cíl: Pro zhodnocení robustnosti PCR bylo simulováno kolísání teploty pro krok nasedání primerů v multiplexní PCR. Tento teplotní krok je kritický pro citlivost a specifickou PCR.

Metodika: Specifická teplota annealingu 60 °C v standardní reakci s kontrolní DNA při nominální koncentraci 1 ng se měnila o ± 1 °C a ± 2 °C. Byla provedena trojnásobná analýza se stejným master mixem.

Výsledky: Nebyly nalezeny žádné nespecifické vedlejší produkty > 200 RFU v rozsahu alel pro ± 1 °C. Průměrné výšky píku se odchylovaly maximálně o ± 30 % od standardní reakce při ± 1 °C. U + 2 °C již byly v některých systémech detekovány silné signály (HLD 84, 103, 116, 112, 133, 105, 140, 67, 48), jeden systém (HLD 91) byl zcela eliminován.

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, specifickou a rovnováhu signálů v multiplexní PCR. Robustnost testu je proto testována vůči různým šaržím dodávaného PCR pufru.

Metodika: Test 4 nezávislých šarží reakční směsi A byl proveden při standardní reakci s kontrolní DNA o nominální koncentraci 1 ng.

Výsledky: Nebyly detekovány žádné nespecifické produkty > 200 RFU. Odchylka průměrných výšek píku ve srovnání se standardní reakcí byla nejvýše 20 %.

A i) Testování krátkodobé stability

Cíl: Stabilita reagensů kitu byla testována po opakovaném zmrazení a rozmrazení.

Metodika: Reagencie kitu byly podrobeny 20-násobnému cyklu zmrazení a rozmrazení. Zmrazení bylo prováděno po dobu alespoň 1 hodiny při -20 °C. Rozmrazování probíhalo při teplotě místnosti a reagencie byly před použitím homogenizovány protřepáním. Následně byla provedena standardní reakce s kontrolní DNA o nominální koncentraci 1 ng a vzorkem bez DNA (NTC) v triplikátech. Výsledky byly porovnány s výsledky standardní reakce bez cyklu zmrazení a rozmrazení.

Výsledky: Odchylka průměrných výšek píku ve srovnání se standardní reakcí byla maximálně 20 % (zejména ztráta signálu). U vzorků bez DNA byly pozorovány další píky > 200 RFU, avšak žádný z těchto píku nekolidoval se specifikací alel, definovaných pro kit. (volná fluorescenční barviva v panelu BTG).

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 PCR amplifikační sada CE-IVD Mentype® **Chimera**® (Biotype GmbH, Drážďany), která je založena na krátkých tandemových repetičích (STR) [12]. Dále cytogenetická diferenciací dárčovských a recipientních leukocytů pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH) [11]. 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

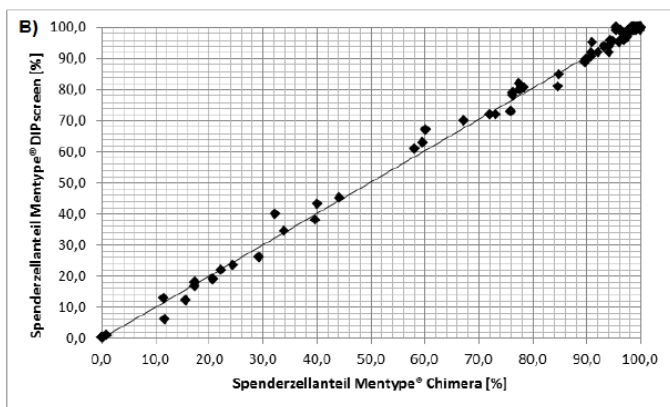
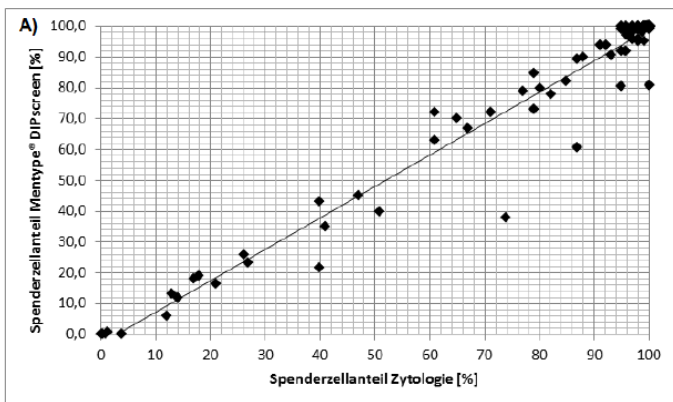
Extrakce DNA z heparinizované plné krve byla provedena pomocí soupravy QIAamp® DNA Blood Mini (Qiagen GmbH, Hilden, DE) podle pokynů výrobce.

B d) Výsledky

V různých dnech po transplantaci alogenních kmenových buněk krve nebo kostní dřeně bylo shromážděno celkem 98 datových souborů dospělých pacientů. Dvojice dárce-recipient se lišily pohlavím, a byly tedy vhodné pro FISH specifický pro pohlavní chromozomy [5]. Na PCR bylo použito alespoň 1,5 ng genomické DNA. Nejprve byly identifikovány všechny informační markery STR nebo DIP párů dárce-recipient a pohlaví bylo potvrzeno genotypizací amelogeninového markeru, který je součástí multiplexních PCR. Pro vyhodnocení PCR byly použity střední hodnoty hladin signálů všech informativních markerů STR nebo DIP [3]. Výsledky srovnávacích testů jsou shrnuty na obrázku 1.

Ve srovnání s cytogenetikou vykazovalo 11 vzorků testovaných s použitím Mentype® **DIPscreen** odchylku frakce dárcovských buněk o více než 5 % (absolutně) (viz obr. 10A). U 5 z těchto vzorků byl pro cytogenetiku použity počty buněk výrazně nižší než 200. Podle doporučení výrobce soupravy FISH by se však mělo spočítat nejméně 200 buněk. Podle praktických doporučení poskytují ještě vyšší absolutní počty buněk (500–1 000) lepší cytogenetické výsledky [6, 8]. Na rozdíl od cytogenetiky, byly rozdíly mezi Mentype® **DIPscreen** a multiplexní PCR soupravě na bázi STR Mentype® **Chimera**® nejvýše 7,9 % (viz obrázek 4B). Pouze 3 z 98 datových souborů vykazovaly odchylku více než 5 %.

Obř.4: Analýza shody multiplexní PCR Mentype® DIPscreen ve srovnání s cytologií (A) a multiplexní PCR Mentype® Chimera (B)



B e) Reference

- 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.dewww.biotype.de