

# Mentype<sup>®</sup> DIPscreen

## Návod k použitiu

### Prvý krok ku kvalifikácii vzorkov chimérizmu

Diagnostika in vitro



DISIFU01v3sk  
Apríl 2023



45-45410-0025  
45-45410-0100



Označenie šarže



BIOTYPE GmbH  
Moritzburger Weg 67  
01109 DRESDEN  
GERMANY

Vyrobené v Nemecku

BIOTYPE GmbH vyvíja, vyrába a distribuuje aplikácie založené na PCR pre lekársku diagnostiku.

Naše testovacie súpravy Mentype® zaručujú najvyššie štandardy kvality pre kliniky a výzkum.

Pre informácie a návrhy sme Vám k radi dispozícii. Kontaktujte nás alebo navštívte našu domovskú stránku [www.biotype.de](http://www.biotype.de)

## Popis produktu

Mentype® **DIPscreen** je multiplexná PCR aplikácia pre identifikáciu informatívnych DIP lokusov pre diferenciáciu darcu / recipienta po alogennej transplantácii kmeňových buniek. Screeningová reakcia detekuje celkom 33 bialelických DIP lokusov spoločne s lokusom amelogeninu ktorý je špecifický pre pohlavie.

Analýza molekulárneho chimérizmu je zásadná pre monitorovanie rastu transplantátu kmeňových buniek alebo pre včasnú detekciu hroziacej odmietavej reakcie. Molekulárna chimérická analýza môže byť vykonaná prostredníctvom analýzy rôznych sekvenčných motívov DNA. Velice výhodné sú polymorfizmy tzv. inzercie / delece DNA (DIPs/INDEL). V porovnaní s inými typmi DNA markerov nevedie PCR amplifikácie týchto DIP-markerov k tvorbe artefaktov „shutter-peaks“, ktoré môžu komplikovať vyhodnotenie analýzy. Navyac, DIP polymorfizmy sú najvhodnejšie pre kvantitatívnu analýzu pomocou qPCR. Diagnostika s kitom Mentype® **DIPscreen** založená na DIP markeroch preto poskytuje jednoznačnú diferenciáciu donora a recipienta a umožňuje efektívne kvantitatívne a spoľahlivé sledovanie stavu chimérizmu.

33 DIP lokusov testovaných Mentype® **DIPscreen** je distribuovaných na 18 chromozómoch, lokusy sú od seba vzdialené aspoň 10 Mbp (Tabuľka 1). Detekčný limit Mentype® **DIPscreen** je **200 pg genomickej DNA**. Optimálny rozsah použitej DNA pre analýzu za štandardných podmienok je 1,0 a 2,0 ng DNA. Primery sú značené fluorescenčnými farbivami **6-FAM, BTG a BTY**.

Validácia a vyhodnotenie testu bolo vykonané na GeneAmp® 9700 Silber (max. režim), Eppendorf Mastercycler ep-S, Biometra T1, ProFlex PCR System, ABI PRISM® 3130 , Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer s použitím 36 cm kapilár a polymeru POP4®.

## Obsah

<b>1. Popis Mentype® DIPscreen.....</b>	<b>5</b>
<b>2. PCR amplifikácia.....</b>	<b>9</b>
2.1 Príprava master mixu .....	9
2.2 Parametry PCR amplifikácie.....	10
<b>3. Kapilárna gelová elektroforéza .....</b>	<b>11</b>
3.1 Príprava produktov PCR.....	11
3.2 Analýza dĺžky fragmentu (fragmentačná analýza) .....	11
<b>4. Vyhodnotenie .....</b>	<b>13</b>
4.1 BIOTYPE templátové súbory .....	14
4.2 Kontroly .....	15
4.3 Dĺžky fragmentov a alely.....	16
<b>5. Interpretácia výsledkov .....</b>	<b>20</b>
<b>6. Referencie .....</b>	<b>21</b>
<b>7. Vysvetlenie symbolov .....</b>	<b>22</b>
<b>A Analytická validácia .....</b>	<b>23</b>
A a) Stanovenie štandardnej reakcie a tolerancií špecifických pre šarže .....	23
A b) Testovanie presnosti genotypovania .....	23
A c) Testovanie analytickej špecifčnosti .....	24
A d) Testovanie analytickej senzitivity .....	24
A e) Testovanie rôznych PCR termocyklov .....	24
A f) Testovanie rôznych zmesných vzorkov DNA .....	25
A g) Testovanie vplyvu rôznych teplôt annealingu v PCR .....	25
A h) Testovanie rôznych šarží PCR pufrov .....	25
A i) Testovanie krátkodobej stability.....	26
<b>B Zhodnotenie klinických parametrov testu.....</b>	<b>26</b>
B a) Odber vzorkov, etické a regulačné hľadiská.....	26
B b) Referenčné metódy .....	26
B c) Extrakcia DNA a prečistenie.....	26
B d) Výsledky .....	27
B e) Referencie .....	29

## 1. Popis Mentype® DIPscreen

**Tabuľka 1.** Prehľad lokusov a relevantných informácií Mentype® DIPscreen

DIP Locus	Chromozomálna Pozícia	Motívy (-DIP / + DIP)
<b>Panel FAM</b>		
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
<b>Panel BTG</b>		
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
<b>Panel BTY</b>		
HLD48	2q11.2	-/GACTT
HLD114	17p13.2	-/TCCTATTCTACTCTGAAT
HLD304	9q34.3	-/GAGCTGCTCAAGAGAGAGG
HLD131	7q36.2	-/TTGGGCTTATT
HLD38	1q32.2	-/TAGTT
HLD82	7q21.3	-
		ACCTCCTACTCCTTGGTCTATTCTCTGGTCACATGTA

Skratky: HLD = DIP ľudského lokusu, -DIP = delece, +DIP = inzercia

Tabuľka 1 ukazuje lokalizáciu na chromozómoch, sekvenčný motív a príslušné referenčné alely DIP lokusov detekovaných pomocou DIP Mentype® **DIPscreen**.

## Obsah

### Mentype® DIPscreen

Titulok	Obsah	Objem	
		25 reakcií	100 reakcií
Nuclease-Free Water	Voda neobsahujúca nukleázy	1,5 mL	2x 1,5 mL
Reaction Mix A	Reakčná zmes A	125 µL	500 µL
Mentype® DIPscreen PrimerMix	Zmes primerov	125 µL	500 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (2,5 U/µL) alebo Polymerase N*	Multi Taq 2 DNA polymeráza alebo polymeráza N*	15 µL	60 µL
Mentype® DIPscreen Control DNA XY82 (2 ng/µL)	Kontrolná DNA XY82 (2 ng/µL)	10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	DNA dĺžkový štandard 550 (BTO)	13 µL	50 µL
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder	Alelický marker	25 µL	25 µL

\* Súprava obsahuje novú Polymerase N z čísla šarže LEUK01107.

Majte na pamäti, že komponenty súpravy z rôznych šarží súpravy nesmú byť zmiešané. Prehľad čísiel šarží je uvedený na etikete, ktorá je umiestnená na vnútornej strane vrchu krabice. Rozdeľovanie komponentov súpravy do iných reakčných nádob nieje povolené.

## Informácie pre objednanie

### Tabuľka 2. Informácie pre objednanie súprav Mentype® DIPscreen

Názov výrobku	Veľkosť balenia	Objednacie číslo
Mentype® DIPscreen	25 reakcií	45-45410-0025
Mentype® DIPscreen	100 reakcií	45-45410-0100

## Skladovanie

Skladovanie by malo prebiehať pri  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Je treba vyhnúť sa opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu. Zmes primerov a alelický marker by mali byť skladované chránené pred svetlom. Kontrolné DNA a post-PCR reagentie (alelický marker a DNA veľkostný štandard) by mali byť skladované oddelene od PCR reagentií. Expirancia kitu je uvedená na etikete obalu.

## Ďalšie reagentie

K-PCR amplifikáciu a prípravu vzorkov potrebujete okrem komponentov obsiahnutých v kitu i nasledujúce reagentie:

**Tabuľka 3.** Ďalšie reagenty potrebné k vykonaniu analýzy s kitom použitie Mentype® **DIPscreen**

Činidlo	Dodavateľ	Objednacie číslo
Hi-Di™ formamid, 25 mL	Applied Biosystems	4311320
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 bezpečnostné upozornenie

Berte prosím na vedomie bezpečnostný list.

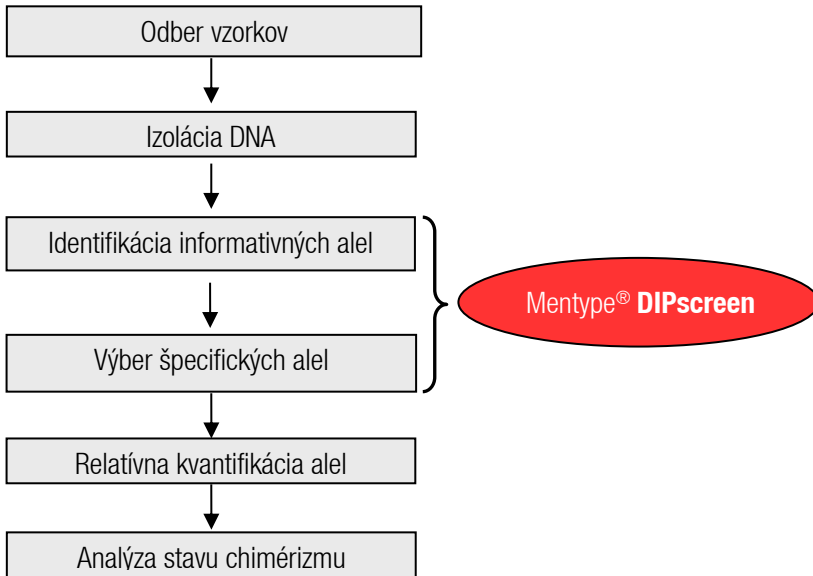
Pre komponenty kitu sú na vyžiadanie k dispozícii bezpečnostné listy. Ohľadne bezpečnostných listov reagentov, ktoré nesú súčasťou kitu, sa obráťte na príslušného výrobcu.

### Dodržanie a kontrola kvality

Celý obsah testovacej súpravy podlieha intenzívnej kontrole kvality spoločnosti BIOTYPE GmbH. Kvalita testovacích súprav je priebežne kontrolovaná, aby sa preukázala ich neobmedzená použiteľnosť. Kontaktujte nás vo všetkých otázkach ohľadne dodržania a kontroly kvality.

### Ochranné známky a patenty

Mentype® je registrovaná ochranná známka spoločnosti BIOTYPE GmbH. ABI PRISM®, GeneMapper®, GeneAmp® a Applied Biosystems® sú registrované ochranné známky spoločnosti Applied Biosystems LLC. POP4® je registrovaná európska ochranná známka spoločnosti Applied Biosystems LLC. PCR je chránené patentom. Vlastníkom patentu je spoločnosť Roche Molecular Systems a F. Hoffmann-La Roche (Roche).

**Prehľad analýzy chimérizmu s kitom Mentype® DIPscreen**

Od vzorkovania po analýzu - analýza chimérizmu pomocou kituMentype® **DIPscreen**



## Protokoly pre PCR amplifikáciu, elektroforéziu a vyhodnotenie

### 2. PCR amplifikácia

#### 2.1 Príprava master mixu

Nasledujúca tabuľka ukazuje objemy použitých PCR reagensí pre reakčný objem 25  $\mu\text{L}$ , vrátane 1,0  $\mu\text{L}$  vzorku (templátová DNA). Pri stanovení počtu PCR reakcií uvažujte tiež o pozitívnej a negatívnej kontrole. Pridajte k celkovému objemu jednu alebo dve reakcie pre kompenzáciu chýb pipetovania.

**Tabuľka 4.** Zloženie PCR Master Mix Mentype® DIPscreen

Komponenty	Objem
Nuclease-Free Water	13,4 $\mu\text{L}$
Reaction Mix A*	5,0 $\mu\text{L}$
Mentype® DIPscreen PrimerMix	5,0 $\mu\text{L}$
Multi Taq 2 DNA Polymerase (2,5 U/ $\mu\text{L}$ ) <b>alebo</b> Polymerase N	0,6 $\mu\text{L}$
<b>Celkový objem hlavnej zmesi</b>	<b>24,0 <math>\mu\text{L}</math></b>
Použitie templátovej DNA alebo kontrol	1,0 $\mu\text{L}$

\* obsahuje  $\text{Mg}^{2+}$ , dNTPs, BSA

Pred namiešaním reakčnej zmesi by mali byť všetky reagentie dobre premiešané (vortex) a krátko odstredené (asi 10 s).

Množstvo použitej templátovej DNA závisí na jej koncentrácii. Pre referenčné vzorky obvykle postačí 1  $\mu\text{L}$ . U kritických vzorkov s nízkou koncentráciou DNA možno odpovedajúcim spôsobom zvýšiť množstvo templátu. Doplňte konečný reakčný objem vodou (nuclease-free) tak, aby bol celkový reakčný objem PCR 25  $\mu\text{L}$ .

Uchovávajúte svoje vzorky DNA vo vode (nuclease-free) alebo v zriedenom TE pufru (10 mM Tris HCl, pH 8,0 a 1 mM EDTA), napr. 0,1 x TE pufr.

Primer mixy sú upravené pre dosiahnutie optimálnych výšok píky v **28 PCR cykloch** s **1 ng kontrolnej DNA XY82** v reakčnom objeme 25  $\mu\text{L}$ . Pokiaľ sa použije viac templátovej DNA, možno očakávať vyššie píky pre malé fragmenty PCR a relatívne nízke píky pre väčšie fragmenty PCR. Ak chcete túto nerovnováhu upraviť, znížte množstvo DNA.

#### Templátová DNA

Optimálne množstvo DNA je **1-2 ng na reakcii**. V závislosti na použitej kvantifikačnej metóde sa môže zameraná hodnota koncentrácie DNA líšiť, takže môže byť nutné upraviť optimálne množstvo DNA.

#### Pozitívna kontrola

Pre pozitívnu kontrolu zriedte kontrolnú DNA XY82 na 1 ng/ $\mu\text{L}$  v príslušnom objeme. Pipetujte zriedenú kontrolnú DNA namiesto zkúmanej templátovej DNA do zkúmaniek obsahujúcich PCR Master Mix.

## Negatívna kontrola

Ako negatívnu kontrolu pipetujte vodu (nuclease-free) miesto templátovej DNA do zrkúmvaviek obsahujúcich PCR master mix.

## 2.2 Parametry PCR amplifikácie

Vykonajte „hot start“ PCR, aby sa aktivovala DNA polymeráza, ktorá zamedzuje tvorbe nešpecifických amplifikačných produktov.

Počet cyklov PCR závisí na množstve použitej DNA. Pre všetky vzorky sa doporučuje 28 cyklov PCR.

## Štandardná metóda

Doporučené pre všetky vzorky DNA

**Tabuľka 5.** Štandardný protokol PCR amplifikácie pre kit Mentype® DIPscreen

Teplota	Čas	
94 °C	4 minúty (hot start pre aktiváciu DNA polymerázy)	
94 °C	30 s	
<b>60 °C</b>	<b>120 s</b>	<b>28 cyklov</b>
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	do konca

**Poznámka:** U PCR cyklérov s funkciou nastaviteľnosti rýchlosti ohrevu a chladenia upravte pre dosiahnutie optimálnych výsledkov ramping na približne 4 až 5 °C/s.

Veľice nízke koncentrácie DNA môžu viesť k alelickým výpadkom a nevyváženým výškam píku. Navyše sa zvyšuje pravdepodobnosť nešpecifických amplifikačných produktov. So zvyšujúcim sa počtom cyklov môže prísť tiež ku zkríženej kontaminácii v dôsledku minimálneho množstva kontaminantov (cudzíe DNA).

### 3. Kapilárna gelová elektroforéza

#### 3.1 Príprava produktov PCR

Po dokončení PCR odoberte vzorky z cykléru a krátko odstred'te. Rozmrazte reagentie Hi-Di™ formamid (nieje súčasťou súpravy) a DNA Size Standard 550 (BTO), skúmavky krátko premiešajte a krátko odstred'te. Pripravte si zmes Hi-Di™ Formamidu a DNA Size Standard 550 (BTO) popísanú v tabuľke 6 pridajte jednu alebo dve reakcie navyiac pre kompenzáciu chýb pipetovania.

**Tabuľka 6. Zloženie denaturačnej zmesi**

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

Pipetujte 12 µL denaturované zmesi formamidu a DNA Size Standard 550 (BTO) do príslušného počtu jamiek na PCR doštičke (vhodné pre použitie v genetickom analyzátoze). Potom pridajte buď 1 µL PCR produktu alebo 1 µL alelického markeru (Allelic Ladder) Mentype® **DIPscreen** na jamku. PCR doštičku utesnite vhodnou fóliou, vortexujte a krátko odstred'te.

**Upozornenie:** Alelický marker sa používa k správnej identifikácii fragmentov hodnotených behom analýzy dat. V každom behu fragmentačnej analýzy musí byť alelický marker analyzovaný aspoň raz, aby bola zajistená úspešná analýza dat.

**Upozornenie:** Kapiláry prístroja pre gelovú elektroforézu by nemali bežať na sucho. Pokiaľ sa vzorky nenachádzajú vo všetkých pozíciách kapilár, doplňte ďalšie jamky doštičky 12 µL Hi-Di™ formamidom podľa čísla kapiláry.

Prípravené PCR produkty denaturujte na PCR cykléru po dobu 3 minút pri 95 °C, potom čo ochladíte v cykléru na 4 °C. Vzorky pred fragmentačnou analýzou krátko odstred'te.

#### 3.2 Analýza dĺžky fragmentu (fragmentačná analýza)

Obecné pokyny pre analyzátoz, prípravu matrice a použitie softwaru GeneMapper™ nájdete v príslušnom prievodcovi *ABI PRISM® Uživatelská príručka pre genetický analyzátoz*.

Po úspešnom dokončení spektrálnej kalibrácie prístroja pre kapilárne gelovú elektroforézu so štandardom Matrix BT5 multi (BIOTYPE GmbH) vytvorte špecifický „run modul“ (ABI 3130) alebo „instrument protokol“ (ABI 3500) s nasledujúcimi parametrami:

**Tabuľka 7.** Špecifické parametry fragmentačnej analýzy Mentype® DIPscreen

	ABI 3130	ABI 3500
Injections Voltage [kV]	3.0	3.0
Run Time	1500 s	1500 s
Injection Time [s]	10	10

Hodnoty uvedené v tabuľke 7 možno upraviť tak, aby sa analyzovali všetky fragmenty (60-550 bp) veľkostného štandardu 550.

**Upozornenie:** Pri nastavovaní špecifických parametrov analýzy postupujte podľa pokynov výrobcu prístroja pre kapilárnu gelovú elektroforézu.

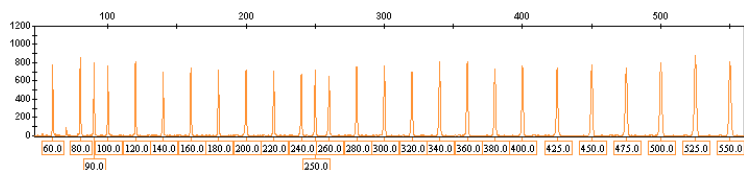
**Upozornenie:** Berte na vedomie tiež ďalšie informácie o kalibrácii a aplikácii produktov Mentype® na kapilárnej gelovej elektroforéze . Sú k dispozícii na vyžiadanie na adrese [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de) od BIOTYPE GmbH.

#### 4. Vyhodnotenie

Obecné pokyny pre automatické vyhodnotenie nájdete v príslušnej príručke *GeneMapper® Uživatelská príručka k softwaru ID / ID-X*.

**Poznámka:** Pri hodnotení Mentype® **DIPscreen** by mal byť skrytý červený panel.

Stanovenie presných dĺžok amplifikovaných produktov závisí na type zariadení, na podmienkach elektroforézy a na použitej DNA veľkostnom štandarde. Pre zistenie spoľahlivej analýzy by sa pre určenie dĺžky malo použiť čo najviac rovnomerne rozložených referenčných fragmentov. K tomu používate veľkostný DNA štandard 550 (BTO) s dĺžkami fragmentov **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 veľkostného DNA štandardu 550 (BTO), dĺžky fragmentov v bp

**Poznámka:** Pre vyhodnotenie a analýzu Mentype® **DIPscreen** so štandardom 550 (BTO), pomocou softwaru *GeneMapper® ID/ID-X*, môže byť použitý templátový súbor *SST-BTO\_60-450 bp*.

#### 4.1 BIOTYPE templátové súbory

Identifikácia alel separovaných produktov PCR (genotypizácia) by mala byť vykonaná s pomocou vhodného vyhodnocovacieho softwaru, napr. s GeneMapper® ID/ID-X v kombinácii s templátovými súbormi Mentype® **DIPscreen**.

Templátové súbory BIOTYPE nájdete na našej domovskej stránke ([www.biotype.de](http://www.biotype.de)).

Doporučené templátové súbory BIOTYPE pre software GeneMapper® ID/ID-X sú:

Panels	DIPscreen_Panels_v1/v1X	alebo vyššia verzia
BinSets	DIPscreen_Bins_v1/v1X	alebo vyššia verzia
Size Standard	SST-BT0_60-450bp	
Analysis Method	Analysis_DIPscreen_3130_1000rfu	
	Analysis_DIPscreen_3130_200rfu	
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 alleles	

Panely a BinSety musia byť použité vždy, ďalšie templátové súbory sú voliteľné.

Templátové súbory BIOTYPE pre software GeneMapper® ID/ID-X boli generované pre použitie polymeru POP4®. Pri použití iných typov polymerov je nutné prípadne vykonať zmeny panelov a BinSets a metódy analýzy predtým, než sú analyzované údaje.

Podrobné inštrukcie, viz naše webové stránky ([www.biotype.de](http://www.biotype.de)) ako podklady k stiahnutiu v časti Templátové súbory BIOTYPE GeneMapper®.

**Dôležité upozornenie:** Import a identifikácia alel s pomocou ponúkaných templátových súborov je možné zaručiť iba v prípade použitia software GeneMapper® ID/ID-X ID. Pri použití software Genemapper® môžu byť zaznamenané problémy s importom niektorých templátových súborov. V tom prípade by sa mali upraviť panely a bin sety u jedného alebo viac behov s alelickým markerom. V prípade potreby sa obráťte na našu podporu pre pomoc ([support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)).

#### Obecný postup pre vyhodnocovanie

1. Skontrolujte DNA veľkostný štandard
2. Skontrolujte alelický marker (Allelic Ladder)
3. Skontrolujte pozitívnu kontrolu
4. Skontrolujte negatívnu kontrolu
5. Vyhodnoťte data vzorkov

## 4.2 Kontroly

Kontrolná DNA XY82 ktorá je súčasťou kitu v Mentype® **DIPscreen** a ďalšie komerčne dostupné DNA reprezentujú nasledujúce alely:

**Tabuľka 8.** Alely identifikované s Mentype® **DIPscreen**, -DIP = delece, +DIP = inzercia

Lokus	Kontrolná DNA XY82	Kontrolná 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	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+

Referenčné DNA K-562 je dostupné od ATCC. DNA 9947A, 9948 a 3657 možno zakúpiť od Coriell Cell Repositories

### 4.3 Dĺžky fragmentov a alely

Hodnoty dĺžky fragmentov jednotlivých alel sú uvedené v Tabulke 9. Všetky analýzy boli vykonané na analyzátoře ABI PRISM® 3130 s polymerom POP-4® a veľkostným DNA štandardom 550 (BTO). Pri použití iných analyzátorov, DNA veľkostných štandardov alebo polymerov, sa môžu dĺžky fragmentov líšiť.

Vzhľadom k rozdielom špecifickým pre zariadenie sa doporučuje individuálne nastavenie použitého zariadenia (jemné doladenie) po zmeraní dĺžky fragmentov.

Okrem toho by malo byť vykonané vizuálne porovnanie s alelickým markerom.

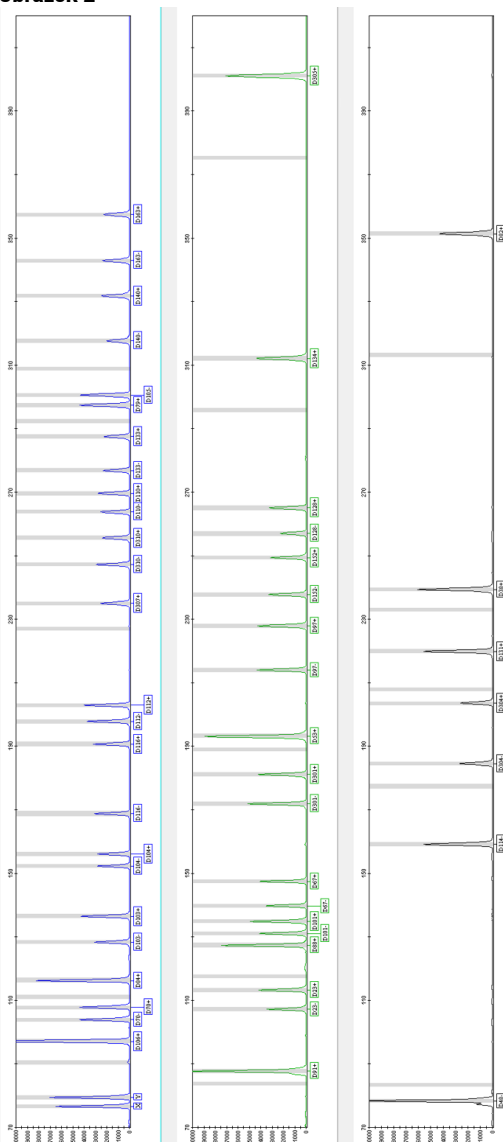
#### Rozsah

Horizontálny: 70-430 bp (viz obr. 2 a 3)

Vertikálny: podľa intenzity signálu vzorkov

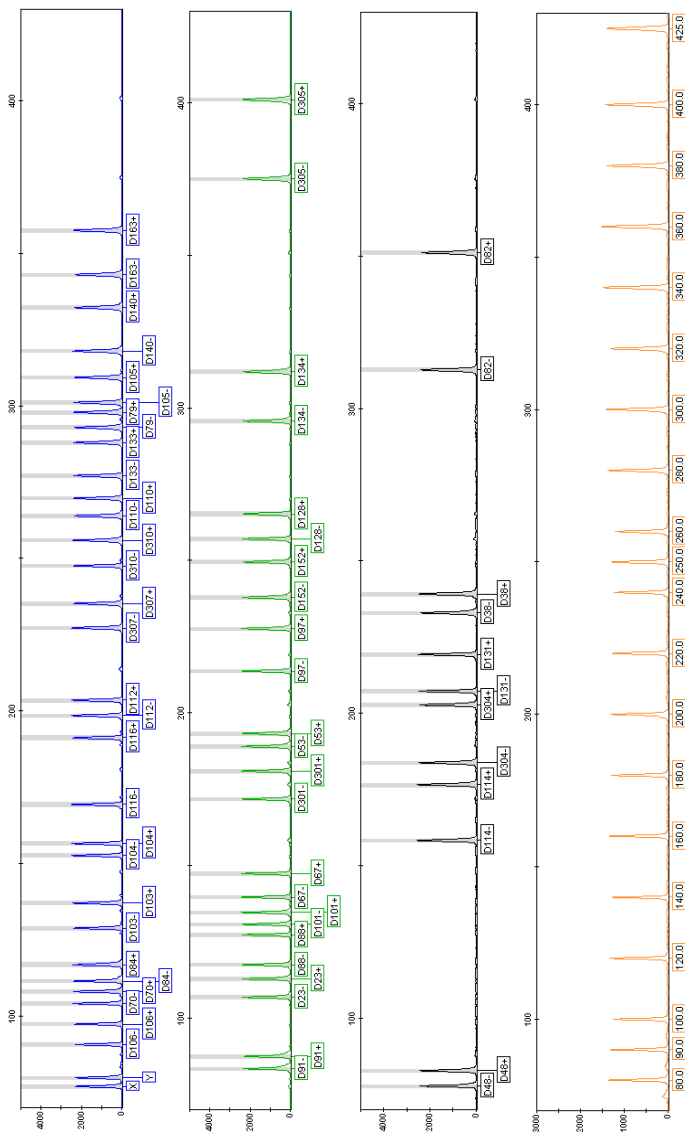


Obrázok 2



**Obr. 2** Elektroferogram Mentype® **DIPscreen** s použitím 1 ng kontrolnej DNA XY82. Analýza bola vykonaná na ABI PRISM® 3130 genetickom analyzátoe s POP4®. Použitým DNA Size štandardom bol BTO 550. Identifikácia alel bola vykonaná pomocou softwaru GeneMapper® ID a templátových súborov Mentype® **DIPscreen**.

Obrázok 3



**Obr. 3** Elektroferogram alelického markeru Mentype® DIPscreen. Analýza prebehla na prístroji ABI PRISM® 3130 s POP4® a DNA štandardom Size 550 (BTO). Identifikácia alel bola vykonaná s pomocou softwaru GeneMapper® ID a templátových súborov Mentype® DIPscreen.

**Tabuľka 9.** Dĺžka fragmentov alelického markeru Mentype® **DIPscreen**, merané na genetickom analyzátoe ABI PRISM® 3130 s polymerom POP4® (FAM, BTG, BTY Panel) ABI PRISM® 3130 genetický analyzátoe s POP4® polymerom (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

\* zaokrúhlené na celé čísla

## 5. Interpretácia výsledkov

Vyššie popísané vyhodnotenie s automatickou identifikáciou alel zaistí uje presnú a spoľahlivú diferenciáciu alel.

### „Pull-up Peaks“

„Pull-up peaks sa môžu vyskytovať v prípade, kedy je pre analýzu použitá nevhodná matrica alebo pokiaľ sú výšky pikov mimo lineárny detekčný rozsah prístroja. Objavujú sa v rovnakej polohe ako špecifické vrcholy, ale v iných farebných paneloch (obvykle s nižšou intenzitou signálu).

### Pripojenie nukleotidov nezávislých na templáte

Taq DNA polymeráza má kvôli svojej terminálnej transferázovej aktivite tendenciu viazať adenosin na 3'-koniec amplifikovaného DNA fragmentu. Pokiaľ systém PCR nemá dostatok času na predĺženie alebo pokiaľ sekvencie primerov nezaistia predĺženie, toto pripojenie nenastane. Tento artefakt je rozpoznateľný výskytom zkráteného fragmentu s jednou bázou (pík -1 bp), v porovnaní s očakávaným fragmentom. Všetky primery BIOTYPE sú navrhnuté tak, aby minimalizovali tvorbu artefaktu. Okrem toho je tvorba artefaktu znížená konečným krokom extenzie v protokole PCR (68 °C po dobu 60 min). Výška píku artefaktu sa zvyšuje pri vysokých kvantitách DNA. Pre vyhodnotenie píkov by si každé analytické laboratórium malo stanoviť svoje vlastné limity.

### Artefakty

Teplota v miestnosti môže výrazne ovplyvniť chovanie PCR produktov na kapilárnej elektroforéze a môže viesť k výskytu „shoulder peaks“ alebo dvojitych, rozdelených píkov. Okrem toho môže byť ovplyvnená automatická identifikácia alel. Pokiaľ sú pozorované tieto javy, doporučujeme novú injektáž vzorkov pri vyššej teplote miestnosti a prípadne použitie viac ako jedného alelického markru na run.

### Vplyv typu polymeru

Kit Mentype® **DIPscreen** bol validovaný a certifikovaný pre použitie polymeru POP4®. Použitie iného polymeru (napr. POP7™ alebo POP6™) môže ovplyvniť chovanie špecifických produktov PCR. Okrem toho môže byť pozorovaný zvýšený šum pozadia v dôsledku pozmeneného chovania volných zbytkov fluorescenčného farbiva.

## 6. Referencie

**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.

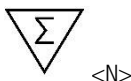
## 7. Vysvetlenie symbolov



**Výrobca**



**Označenie šarže**



**Dostatočné pre testy <N>**



**Odkaz na eIFU**



**Možno použiť do**



**Obmedzenie teploty**



**Objednacie číslo**



**Diagnostika in vitro**



**Chráňte pred svetlom**



**Udržujte v suchu**

## Špecifikácia sady Mentype® DIPscreen

### A Analytická validácia

#### A a) Stanovenie štandardnej reakcie a tolerancií špecifických pre šarže

**Cieľ:** Boli stanovené štandardné reakcie a tolerancie špecifické pre šarže s ohľadom na absolútne úrovne signálu (RFU), rovnováhu signálnych úrovní multiplexnej PCR a baseline.

**Metodika:** Testovacia súprava obsahuje kontrolnú DNA XY13 zdravého darcu, ktorý je heterozygotný v 17 systémoch DIP a amelogeninu. Štandardná reakcia (28 PCR cyklov) bola vykonávaná s touto kontrolnou DNA v nominálnej koncentrácii 1 ng v tetraplikátoch. Boli tiež pridané štyri kontroly bez templátovej DNA (NTC).

**Výsledky:** Po zmiešaní PCR primerov z rôznych šarží boli stanovené nasledujúce špecifikácie: Pri použití genetického analyzátoru ABI PRISM® 3130 dosahovali signály hodnôt 1 000–5 000 RFU. Kolísanie výšky signálov heterozygotných systémov by nemalo prekročiť 50 % smernej hodnoty. Neboli nájdené žiadne nešpecifické signály < 200 RFU pre slepé vzorky.

#### A b) Testovanie presnosti genotypovania

**Cieľ:** Presnosť identifikácie alel by mala byť štatisticky overená za štandardných podmienok. Test overil zhodu výsledkov u predom ogenotypovaných vzorkov medzi automatickou identifikáciou alel s pomocou alelického ladderu a priradením alel s pomocou iných metód (iné sady PCR, priame sekvencovanie atd.) pri využití softwaru GeneMapper ID. Na základe výsledkov bolo určené nastavenie prístroja pre daný test genotypizácie kapilárnou gelovou elektroforézou (Bins a Panels).

**Metodika:** 100 predom ogenotypovaných ľudských DNA od darcov z rôznych zdrojov (plná krv, tvarové stery) bolo otestované v samostatných nezávislých reakciách. Okrem toho bola testovaná negatívna kontrola (vzorek bez DNA). Ako akceptačné kritérium boli definované úplné profily pikov s výškou > 200 RFU (ručné vyhodnotenie) [1; 2].

**Výsledky:** Po determinácii nastavenia prístroja v danom teste bol všetkým vzorkom DNA priradený správny genotyp pre všetky systémy HLD i pre amelogeninový marker.

**A c) Testovanie analytickej špecifičnosti**

**Cieľ:** Štúdiá boli navrhnuté tak, aby vylúčili falošne pozitívne výsledky z dôvodu zkríženej reaktivity s vybranými vzorkami DNA iného než ľudského pôvodu. V klinickej praxi však môže byť nehumánne DNA z dôvodu sterilného vzorkovania do značnej miery vylúčená.

**Metodika:** Bolo testované 2,5 ng genomické DNA z *Bos taurus* (skot), *Sus scrofa domestica* (domáce prasatá), *Canis lupus familiaris* (pes), *Felis catus* (kočka) a *Oryctolagus cuniculus* (domáci králik). DNA zo zvierat pochádzala zo vzorkov krvi, ktoré boli poskytnuté ako zbytok veterinárneho vyšetrovania.

**Výsledky:** V oblasti alel (< 200 RFU) nebola nájdená žiadna zkrížená reaktivita.

**A d) Testovanie analytickej senzitivity**

**Cieľ:** Test bol použitý k určeniu limitu analytickej detekcie (citlivosti).

**Metodika:** Zriedňujúca rada bola testovaná s 1 ng až 65 pg referenčnou DNA v tetraplikátoch. Kritéria akceptácie boli definované ako úplné profily DNA s > 100 RFU.

**Výsledky:** Bol stanovený detekčný limit 200 pg genomickej DNA.

**A e) Testovanie rôznych PCR termocyklov**

**Cieľ:** PCR termálny cyklér od rôznych výrobcov sa líši svojimi špecifikáciami. Predovšetkým môžu existovať rôzne rýchlosti zahrievania a chladenia, ako aj rôzne techniky regulácie teploty.

**Metodika:** Štandardná reakcia so stejným master mixom a s kontrolnou DNA v koncentrácii 1 ng bola vykonaná v tetraplikátoch so všetkými termocyklérmi popísanými v oddiele 1.1. Okrem toho boli skúmané 2 vzorky NTC bez DNA.

**Výsledky:** Neboli detekované žiadne nešpecifické vedľajšie produkty > 200 RFU.

Odchýľka priemerných výšok píku v zrovnaní so štandardnou reakciou bola 20 % pri definovanom rampingu  $\geq 2$  °C/s, maximálne 20 %.



### A f) Testovanie rôznych zmesných vzorkov DNA

**Cieľ:** Cieľom analýzy chimérizmu po alogennej transplantácii kmeňových buniek krvi je samostatná detekcia a relatívna kvantifikácia DNA darcu a recipienta. Pre detekciu minimálneho zbytkového onemocnenia by malo byť možné detekovať čo najmenšie množstvo recipientnej DNA v zmesi. Pri analytickej validácii boli preto pripravené rôzne zmesi dvoch definovaných DNA s rôznymi genotypmi.

**Metodika:** Bolo pripravených 10 nezávislých zmesí každé z dvoch nepríbuzných DNA, s deficitnou DNA v 0 %, 1 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 % a 70 % roztoku. Medzi dvoma DNA v zmesiach bolo pre vyhodnotenie použité priemerne 13 DIP lokusov ( $12,8 \pm 2,22$ ) s informatívnymi alelami. Vo všetkých prípadoch boli testované 2 ng zmesi DNA (viz kapitola c) v štandardnom reakčnom profile. Boli hodnotené signály s najmenej 50 RFU.

**Výsledky:** Pre deficitnú DNA bolo možné dosiahnuť detekčného limitu 1 %. To odpovedá hodnotám 1–5 % dosiahnutým s forenznými súpravami STR používanými pri analýze chimérizmu [3-6].

### A g) Testovanie vplyvu rôznych teplôt annealingu v PCR

**Cieľ:** Pre zhodnotenie robustnosti PCR bolo simulované kolísanie teploty pre krok nasadania primerov v multiplexnej PCR. Tento teplotný krok je kritický pre citlivosť a špecifickosť PCR.

**Metodika:** Špecifická teplota annealingu 60 °C v štandardnej reakcii s kontrolnou DNA pri nominálnej koncentrácii 1 ng sa menila o  $\pm 1$  °C a  $\pm 2$  °C. Bola vykonaná trojnásobná analýza s rovnakým master mixom.

**Výsledky:** Neboli nájdené žiadne nešpecifické vedľajšie produkty > 200 RFU v rozsahu alel pre  $\pm 1$  °C. Priemerné výšky píku sa odchylovali maximálne o  $\pm 30$  % od štandardnej reakcie pri  $\pm 1$  °C. U + 2 °C už boli v niektorých systémoch detekované silné signály (HLD 84, 103, 116, 112, 133, 105, 140, 67, 48), jeden systém (HLD 91) bol úplne eliminovaný.

### A h) Testovanie rôznych šarží PCR pufov

**Cieľ:** Pomery koncentrácií medzi komponentami obsiahnutými v PCR pufru reakčnej zmesi A (dNTP, koncentrácia iontov, najmä  $Mg^{2+}$ ) sú kritické pre citlivosť, špecifickosť a rovnováhu signálov v multiplexnej PCR. Robustnosť testu je preto testovaná voči rôznym šaržám dodávaného PCR pufru.

**Metodika:** Test 4 nezávislých šarží reakčnej zmesi A bol vykonaný pri štandardnej reakcii s kontrolnou DNA o nominálnej koncentrácii 1 ng.

**Výsledky:** Neboli detekované žiadne nešpecifické produkty > 200 RFU. Odchýľka priemerných výšok píku v porovnaní so štandardnou reakciou bola najviac 20 %.

## A i) Testovanie krátkodobej stability

**Cieľ:** Stabilita reagensí kitu bola testovaná po opakovanom zmrazení a rozmrazení.

**Metodika:** Reagencie kitu boli podrobené 20-násobnému cyklu zmrazenia a rozmrazenia. Zmrazenie bolo vykonávané po dobu aspoň 1 hodiny pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Rozmrazovanie prebiehalo pri teplote miestnosti a reagencie boli pred použitím homogenizované pretrepaním. Následne bola vykonaná štandardná reakcia s kontrolnou DNA o nominálnej koncentrácii 1 ng a vzorkom bez DNA (NTC) v triplikátoch. Výsledky boli porovnané s výsledkami štandardnej reakcie bez cyklu zmrazenia a rozmrazenia.

**Výsledky:** Odchýľka priemerných výšok piky v porovnaní so štandardnou reakciou bola maximálne 20 % (najmä strata signálu). U vzorkov bez DNA boli pozorované ďalšie piky  $> 200$  RFU, avšak žiadny z týchto pikov nekolidoval so špecifikáciou alel, definovaných pre kit. (voľné fluorescenčné farbivá v panelu BTG).

## B Zhodnotenie klinických parametrov testu

### B a) Odber vzorkov, etické a regulačné hľadiská

Bolo vykonané klinické štúdium hodnotenia výkonu kitu podľa § 20 až § 24 zákona o lekárskech výrobkoch (DE). Oslobodenie schvalovacej povinnosti pre lekárske výrobky s nízkym bezpečnostným rizikom podľa § 7 nariadenia o klinických zkuškách lekárske výrobkov bolo udelené Spolkovým ústavom pre liečiva a lekárske výrobky. K dispozícii bolo kladné hlasovanie príslušnej etickej komisie a prehlásenie o súhlase pacienta.

Bola použitá heparinizovaná žilná plnohodnotná krv.

### B b) Referenčné metódy

Ako zrovnávací test slúžila PCR amplifikačná sada CE-IVD Mentype® **Chimera**® (BIOTYPE GmbH, Drážďany), ktorá je založená na krátkych tandemových repetíciách (STR) [12]. Ďalej cytogenetická diferenciácia dárcovských a recipientných leukocytov pomocou fluorescenčnej in situ hybridizácie (FISH) [11]. Sériová chromozomová špecifická CE-IVD CEP® X Spectrum Orange™ / Y Spectrum Green™ priamo značená fluorescenčná DNA sonda (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, DE) bola použitá podľa pokynov výrobcu.

### B c) Extrakcia DNA a prečistenie

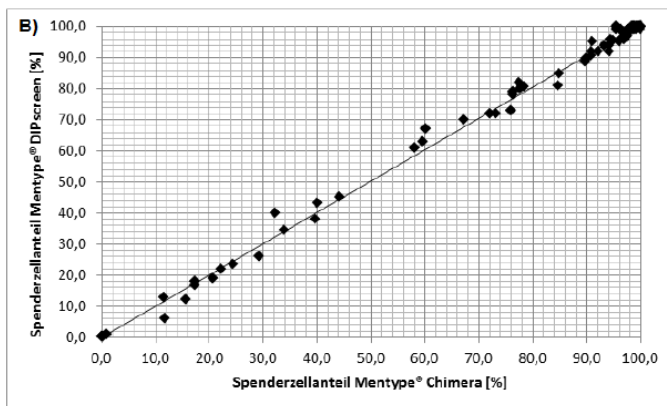
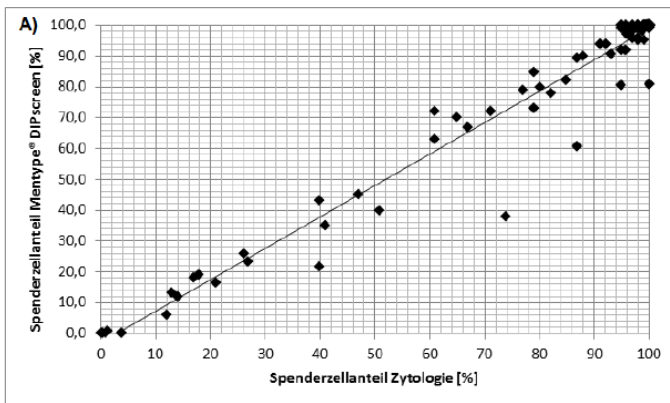
Extrakcia DNA z heparinizovanej plnej krvi bola vykonaná pomocou súpravy QIAamp® DNA Blood Mini (Qiagen GmbH, Hilden, DE) podľa pokynov výrobcu.

**B d) Výsledky**

V rôznych dňoch po transplantácii alogénnych kmeňových buniek krvi alebo kostnej drene bolo zhromaždené celkom 98 datových súborov dospelých pacientov. Dvojice dárca-recipient sa líšili pohlavím, a boli teda vhodný pre FISH špecifické pre pohlavné chromozómy [5]. Na PCR bolo použité aspoň 1,5 ng genomickej DNA. Najskôr boli identifikované všetky informačné markery STR alebo DIP párov dárca-recipient a pohlavie bolo potvrdené genotypizáciou amelogeninového markeru, ktorý je súčasťou multiplexných PCR. Pre vyhodnotenie PCR boli použité stredné hodnoty hladín signálov všetkých informatívnych markerov STR alebo DIP [3]. Výsledky zrovnávacích testov sú zhrnuté na obrázku 1.

V porovnaní s cytogenetikou vykazovalo 11 vzorkov testovaných s použitím Mentype® **DIPscreen** odchýľku frakcie dárcovských buniek o viac ako 5 % (absolútne) (viz obr. 10A). U 5 z týchto vzorkov boli pre cytogenetiku použité počty buniek výrazne nižšie než 200. Podľa doporučení výrobcu súpravy FISH by sa však malo spočítať najmenej 200 buniek. Podľa praktických doporučení poskytujú ešte vyššie absolútne počty buniek (500–1 000) lepšie cytogenetické výsledky [6, 8]. Na rozdiel od cytogenetiky, boli rozdiely medzi Mentype® **DIPscreen** a multiplexnej PCR súprave na bázi STR Mentype® **Chimera**® najviac 7,9 % (viz obrázok 4B). Iba 3 z 98 datových súborov vykazovali odchýľku viac ako 5 %.

**Obr.4:** Analýza zhody multiplexný PCR Mentype® DIPscreen v porovnaní s cytologiu (A) a multiplexnou PCR Mentype® Chimera (B)



**B e) Referencie**

- 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 / GERMANY  
Tel. +49 351 8838 400  
Fax +49 351 8838 403  
[support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)  
[www.biotype.de](http://www.biotype.de)