

Mentype[®] Chimera[®]

Návod na použitie

Nový štandard v analýze chimérizmu

Diagnostika in vitro



CHNIFU01v2sk
Máj 2021



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



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 sady Mentype® zaručujú najvyššie štandardy kvality pre klinický a výskum a diagnostiku.

Pre informácie a návrhy sme vám radi k dispozícii. Kontaktujte nás alebo navštívte našu domovskú stránku www.biotype.de

Mentype® Chimera®

Popis výrobku

Mentype® **Chimera**® multiplexná PCR aplikácia vyvinutá na analýzu chimérizmu po transplantácii kmeňových buniek krvi alebo kostnej drene. Súprava bola špeciálne navrhnutá na kontrolu rastu darcovských buniek po transplantácii. Kit

Mentype® **Chimera**® bol validovaný analýzou chimérizmu na viac ako 200 HLA kompatibilných pároch darcov a príjemcov a vhodnosť testu bola potvrdená komparatívnymi klinickými štúdiami. Súprava je úspešne používaná v rutinej klinickej diagnostike.

Genetické markery použité v kite Mentype® **Chimera**® sú distribuované na 12 chromozómoch a predstavujú vysoko polymorfne mikrosatelity (STR) s vysokou heterozygotnosťou a vyváženou distribúciou alel. Tieto vlastnosti zvyšujú šancu nájsť informačné lokusy pre diferenciaciu darcu-recipienta, a poskytujú spoľahlivú a robustnú analýzu chimérizmu.

Jedna PCR reakcia súčasne amplifikuje dvanásť vysoko polymorfných autosomálnych lokusov D2S1360, D3S1744, D4S2366, D5S2500, D6S474d, D7S1517, D8S1132, D10S2325, D12S391, D18S51, D21S2055, SE33 (ACTBP2) a lokus amelogeninu špecifického pre pohlavie. Jeden prípad na každý lokus je označený fluorescenčnými farbivami 6-FAM, BTG alebo BTY.

Detekčný limit kitu Mentype® **Chimera**® je **200 pg genomickej DNA**. Optimálny rozsah pri štandardných podmienkach je **0,2-1,0 ngDNA**.

Validácia a hodnotenie súpravy sa vykonalo na ermocykleri GeneAmp® 9700 Aluminium, Eppendorf Mastercycler ep-S, Biometra, ABI PRISM® 310 analyzátore s POP-4® a ABI PRISM® 3130 s POP-4®.

Obsah

1. Popis Mentype® Chimera®	5
2. PCR amplifikácie	8
2.1 Príprava master mixu	8
2.2 Parametre amplifikácie PCR	9
3. Kapilárna gélová elektroforéza	11
3.1 Príprava výrobkov PCR	11
3.2 Analýza dĺžky fragmentu (fragmentačná analýza)	11
4. Vyhodnotenie	13
4.1 Biotype® templátové súbory	13
4.2 Kontroly.....	14
4.3 Dĺžka fragmentov a alely	15
5. Interpretácia výsledkov.....	22
6. Populačno-genetické údaje.....	23
7. Referencie.....	26
8. Vysvetlenie symbolov	27
Špecifikácia kitu Mentype® Chimera®	28
A Analytická validácia	28
A a) Stanovenie štandardnej reakcie a tolerancie špecifickej pre dávku	28
A b) Testovanie presnosti genotypizácie	28
A c) Testovanie analytickej špecifickosti	29
A d) Testovanie analytickej citlivosti.....	29
A e) Testovanie rôznych termocyklérov PCR.....	29
A f) Testovanie rôznych zložených vzoriek DNA	29
A g) Testovanie vplyvu rôznych teplôt annealingu v PCR	30
A h) Testovanie rôznych dávok pufrův PCR	30
A i) Testovanie inhibítův PCR	31
A j) Stabilita po otvorení	31
B Vyhodnotenie klinických parametrov testu.....	32
B a) Odber vzoriek, etické a regulačné aspekty	32
B b) Referenčné metódy.....	32
B c) Extrakcia DNA a prečistenie.....	32
B d) Výsledok	32
B e) Referencie.....	33

1. Popis Mentype® Chimera®

Tabuľka 1. Súhrn lokus a príslušných informácií, Mentype® Chimera®

Lokus	GenBank® Accession	Repeatmotív referencie alel	Referenč ná alela	Oblasť alel
Amelogenin X	M55418			
Amelogenin Y	M55419			
D2S1360	G08130	[TATC] ₉ [TGC] 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

Tabuľka 1 ukazuje lokusy STR s ich opakujúcimi sa motívmi a alelami. Nomenklatúra sa riadi smernicami Medzinárodnej spoločnosti pre súdnu genetiku (ISFG) (Bär *et al.*, 1997). Nomenklatúra pre lokusy D8S1132 a D12S391 je definovaná podľa Heringa a Müllera (2001), pre lokusy D4S2366 a D6S474 podľa Beckera *et al.* (2007), pre lokus D10S2325 podľa Wieganda *et al.* (1999) a pre lokus D7S1517 podľa Wieganda a Klintschara (2002). Uvedený rozsah alel zohľadňuje známe alely Národného inštitútu pre štandardy a technológie (NIST, stav 12 / 2008) a aktuálnu literatúru.

Tabuľka 2. Chromozómové mapovanie pre Mentype® Chimera®

Lokus	Chromozómové mapovanie
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**®

Titulok	Obsah	Objem		
		25 Reakcie	100 Reakcie	400 Reakcie
Nuclease-Free Water	Voda neobsahujúca nukleázy	1,5 mL	2x 1,5 mL	6x 1,5 mL
Reaction Mix A	Reakčná zmes A	125 µL	500 µL	2x 1,0 mL
Mentype® Chimera ® Primer Mix	Zmes primerů	63 µL	250 µL	4x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase ALEBO Polymerase N*	Multi Taq 2 DNA polymeráza ALEBO polymeráza N*	10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® Chimera ® Control DNA XY5 ALEBO Kontrolná DNA XY1726	Kontrolná DNA XY5 (2 ng/µL) ALEBO Kontrolná DNA XY1726 (2 ng/µL)	10 µL	10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	DNA dĺžkový štandard 550 (BTO)	13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® Chimera ® Allelic Ladder	Alelický marker	25 µL	25 µL	4x 25 µL

* Súprava obsahuje Polymerase N z čísla šarže **LEUK01093**.

Majte na pamäti, že komponenty súpravy z rôznych šarží súpravy sa nesmú miešať. Prehľad čísel šarží je uvedený na etikete, ktorá je umiestnená na vnútornej strane poklopu škatule. Rozdeľovanie súčastí súpravy do iných reakčných nádob nie je povolené.

Informácie na objednanie

Poznámka: Prosím, majte na pamäti, že reakcie s veľkosťou balenia 1000 sa už nepredávajú.

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

Skladovanie

Skladujte všetky zložky pri teplote – 25 °C až – 15 °C. Treba sa vyhnúť opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu. Zmes primerov a alelický marker by sa mali skladovať chránené pred svetlom. Kontrolná DNA a post-PCR činidlá (alelický marker a štandard veľkosti DNA) by sa mali skladovať oddelene od činidiel PCR. Expirácia kitu je uvedená na etikete obalu.

Ďalšie potrebné činidlá

Na amplifikáciu PCR a prípravu vzoriek potrebujete okrem zložiek obsiahnutých v kite aj tieto činidlá:

Tabuľka 3. Ďalšie činidlá potrebné na použitie Mentype® Chimera®

Činidlo	Dodávateľ	Číslo objednávky
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 bezpečnostné upozornenia

Prosím, vezmite na vedomie kartu bezpečnostných údajov.

Pre komponenty kitu sú k dispozícii karty bezpečnostných údajov na požiadanie. V prípade kariet bezpečnostných údajov činidiel, ktoré nie sú súčasťou testovacej sady, sa obráťte na príslušného výrobcu.

Platné do vrátane šarža LEUK01073 (Reaction Mix A šarža CH1901224)

Amplifikačný kit PCR obsahuje tieto potenciálne nebezpečné látky:

Obsah sady	Chemikálie	Nebezpečenstvo
Reaction Mix A	Azid sodný NaN ₃	Pri požití toxický, pri kontakte s kyselinou sa bude vyvíjať toxický plyn

Dodržanie a kontrola kvality

Celý obsah testovacej súpravy podlieha intenzívnej kontrole kvality spoločnosťou Biotype GmbH. Kvalita kitov sa priebežne skúma, aby sa preukázala ich neobmedzená použiteľnosť. Kontaktujte nás vo všetkých otázkach týkajúcich sa dodržiavania a kontroly kvality.

Ochranné známky a patenty

Mentype® a Chimera® sú registrované ochranné známky spoločnosti Biotype GmbH. ABI PRISM® a GeneScan® sú registrované ochranné známky spoločnosti Applied Biosystems LLC, GeneMapper®, GeneAmp® a Applied Biosystems® sú registrované ochranné známky spoločnosti Applied Biosystems LLC. POP-4® je registrovaná ochranná známka spoločnosti Applied Biosystems LLC v Európe.

PCR je chránené patentom. Vlastníkom patentu sú spoločnosti Roche Molecular Systems a firma Hoffmann-La Roche (Roche).

Protokoly pre PCR amplifikáciu, elektroforézu a vyhodnotenie

2. PCR amplifikácie

2.1 Príprava master mixu

V nasledujúcej tabuľke sú uvedené objemy použitých PCR činidiel pre reakčný objem 25 μL vrátane 1,0 μL vzorky (templátová DNA). Pri určovaní počtu reakcií PCR uvažujte aj o pozitívnej a negatívnej kontrole. Pridajte k celkovému objemu jednu alebo dve reakcie na kompenzáciu chýb pipetovania.

Tabuľka 4. Zloženie 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) ALEBO Polymerase N	0,4 μL
Celkové množstvo reakčnej zmesi	24,0 μL

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

Pred zmiešaním reakčnej zmesi sa všetky činidlá premiešajú (vortex) a krátko odstredia (približne 10 sekúnd).

Množstvo templátovej DNA závisí od jej koncentrácie. Pre referenčné vzorky zvyčajne postačí 1 μL . V prípade kritických vzoriek sa môže množstvo templátu primerane zvýšiť. Doplňte konečný reakčný objem vodou (nuclease free) tak, aby celkový reakčný objem PCR bol 25 μL .

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

Primer mixy sú upravené pre dosiahnutie optimálnych výšok píkovi pri **30 PCR cykloch s 0,5 ng kontrolnej DNA XY5 príp. XY1726** v reakčnom objeme 25 μL . Ak 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 korigovať, znížte množstvo DNA.

Pozitívna kontrola

Poznámka: Súprava obsahuje novú kontrolnú DNA XY1726 z čísla šarže LEUK01071. Tá sa líši od predchádzajúcej kontrolnej DNA XY5 v genetickom profile. Koncentrácia a súvisiaci experimentálny postup sa ponechali rovnaké. Pomocou čísla šarže súpravy a obsahu (na štítku škatule súpravy) môžete určiť, ktorá kontrolná DNA je v súprave. Nový genetický profil a alely, ktoré sa majú detegovať, sú uvedené na obrázku 2B a v tabuľke 9.

Na pozitívnu kontrolu zriedte kontrolnú DNA XY5 na 0,5 ng/ μL v príslušnom objeme. Pipetujte zriedenú kontrolnú DNA do skúmaviek obsahujúcich PCR Master Mix.

Negatívna kontrola

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

Templátová DNA

V závislosti od použitej metódy kvantifikácie sa nameraná hodnota koncentrácie DNA môže líšiť, takže môže byť potrebné upraviť optimálne množstvo DNA.

2.2 Parametre amplifikácie PCR

Uskutočnite „hot start“ PCR, aby sa aktivovala DNA polymeráza Multi Taq 2, ktorá zabraňuje tvorbe nešpecifických amplifikačných produktov.

Počet cyklov PCR závisí od množstva použitej DNA. Vo všeobecnosti sa odporúča 30 cyklov PCR pre všetky vzorky. Pre kritické vzorky (< 100 pg DNA) sa počet cyklov PCR môže zvýšiť až na 32.

Štandardná metóda

Odporúčané pre všetky vzorky DNA

Tabuľka 5. Štandardní PCR amplifikačný protokol

Teplota	Čas	
94 °C	4 minúty	(hot start pro aktivácii DNA polymerázy Multi Taq2)
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	30 cyklov
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	do konca

Voliteľne

Odporúčané pre nízke množstvo DNA

Tabuľka 6. Voliteľný protokol amplifikácie PCR pre vzorky s nízkou koncentráciou DNA

Teplota	Čas	
94 °C	4 minúty	(hot start pro aktiváciu DNA polymerázy Multi Taq2)
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	32 cyklov
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	do konca

Poznámka: V prípade cyklérov PCR s funkciou rýchleho ohrevu a chladenia (> 2 °C/s) upravte ramping na 2 °C/s, aby sa dosiahli optimálne výsledky.

Veľmi nízke koncentrácie DNA môžu viesť k alelickým výpadkom a nevyváženým výškam píku. Okrem toho sa zvyšuje pravdepodobnosť nešpecifických amplifikačných produktov. So zvyšujúcim sa počtom cyklov môže dôjsť aj ku skříženej kontaminácii v dôsledku minimálneho množstva kontaminantov (napr. cudzej DNA).

3. Kapilárna gélová elektroforéza

3.1 Príprava výrobkov PCR

Po ukončení PCR odoberte vzorky z cyklu a krátko odstred'ujte. Rozmrzajte činidlá Hi-Di™ formamid (nie sú súčasťou súpravy) a DNA Size Standard 550 (BTO), krátko premiešajte a krátko odstred'ujte. Pripravte si zmes Hi-Di™ formamidu a DNA Size Standard 550 (BTO) opísanú v tabuľke 7, pridajte jednu alebo dve ďalšie reakcie na kompenzáciu chýb pri pipetovaní.

Tabuľka 7. Zloženie denaturačnej zmesi

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

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

Upozornenie: Alelický marker sa používa na správnu identifikáciu fragmentov hodnotených počas analýzy údajov. Pri každom teste fragmentárnej analýzy sa musí aspoň raz analyzovať alelický marker, aby sa zabezpečila úspešná analýza údajov.

Upozornenie: Kapiláre, prístroje na gélovú elektroforézu, by nemali behať nasucho. Ak sa vzorky nenachádzajú vo všetkých polohách kapilár, doplňte ďalšie jamky doštičky 12 µL Hi-Di™formamidom podľa čísla kapiláry.

Pripravené produkty PCR denaturujte v cykléru PCR 3 minúty pri teplote 95 °C a potom ich ochlad'ite v cykléru na 4 °C. Vzorky sa odstred'ujú krátko pred analýzou fragmentácie.

3.2 Analýza dĺžky fragmentu (fragmentačná analýza)

Všeobecné pokyny pre analyzátor, prípravu matrice a používanie softwaru GeneMapper™ nájdete v príslušnej príručke *ABI PRISM® Uživateľská príručka pre genetický analyzátor*.

Po úspešnom ukončení spektrálnej kalibrácie prístroja na kapilárnu gélovú elektroforézu so štandardom Matrix BT5 (Biotype GmbH) vytvorte špecifický „run modul“ (ABI 310, ABI 3130) alebo „instrument protokol“ (ABI 3500) s nasledujúcimi parametrami:

Tabuľka 8. Špecifické parametre pre run modul alebo inštrument protokol prístroja na kapilárnu gélovú 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 rozdiel od hodnôt uvedených v tabuľke 8 sa „run time“ môže upraviť tak, aby sa analyzovali všetky časti (60 – 550 bp) štandardu veľkosti 550.

Upozornenie: Pri nastavovaní špecifických analytických parametrov postupujte podľa pokynov výrobcu prístroja na kapilárnu gélovú elektroforézu.

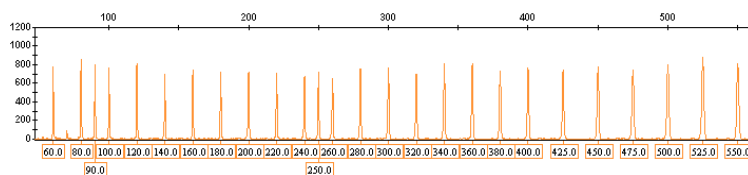
Upozornenie: Pozrite si aj ďalšie informácie o kalibrácii a aplikácii produktov Mentype® na kapilárnu gélovú elektroforézu. Sú k dispozícii na požiadanie na adrese support@biotyper.de od Biotyper GmbH.

4. Vyhodnotenie

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

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

Stanovenie presných dĺžok amplifikovaných produktov závisí od typu zariadenia, podmienok elektroforézy a použitého DNA veľkostným štandardu. Z dôvodu zložitosti niektorých STR lokusov by sa na určenie dĺžky malo použiť čo najviac rovnomerne rozložených referenčných fragmentov. Na to 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 veľkosti DNA štandardu 550 (BTO), dĺžky fragmentov v bp

Poznámka: Na vyhodnotenie a analýzu Mentype® **Chimera**® so štandardom 550 (BTO), pomocou softwaru *GeneMapper® ID/ID-X*, možno použiť templátový súbor SST-BTO_60-500 bp.

4.1 Biotype® templátové súbory

Identifikácia alelov (genotypizácia) by sa mala vykonať pomocou vhodného hodnotiaceho softwaru, napríklad so softwarom *GeneMapper® ID/ID-X* alebo *Genotyper*, v kombinácii s templátovými súbormi Mentype® **Chimera**®. Templátové súbory Biotype® nájdete na stiahnutie na našej domovskej stránke (www.biotype.de). Na požiadanie vám radi zašleme CD-ROM.

Odporúčané templátové súbory Biotype® pre software *GeneMapper® ID/ID-X* sú:

Panels	Chimera_Panels_v1/v1X#	alebo vyššia verzia
BinSets	Chimera_Bins_v1/v1X#	alebo vyššia verzia
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	

#Kvôli novej pozitívnej kontrole sa na vyhodnotenie údajov z čísla šarže **LEUK01071** musia použiť panely a BinsSet **v2**.

Panely a BinSety sa musia použiť vždy, ďalšie templátové súbory sú voliteľné.

Ďalšie templátové súbory Biotype® pre software GeneMapper® ID-X:

Stutter * Chimera_Stutter_v1X# Alebo vyššia verzia

* Pri načítaní uvedených panelov nie sú nastavenia shutterov akceptované, preto musí byť súbor shutteru importovaný navyše.

Dôležité upozornenie: Import a identifikácia alelov s použitím ponúkaných templátových súborov možno zaručiť len v prípade použitia software GeneMapper® ID/ID-X ID: Pri použití software GeneMapper® môžu byť zaznamenané problémy s dovozom niektorých templátových súborov. V tom prípade by ste mali upraviť panely a bin sety pri jednom alebo viacerých behoch s alelickým markerom. V prípade potreby sa obráťte na našu pomoc (support@biotype.de).

Všeobecný postup hodnotenia

1. Skontrolujte DNA štandard veľkosti
2. Skontrolujte alelický marker (Allelic Ladder)
3. Skontrolujte pozitívnu kontrolu
4. Skontrolujte negatívnu kontrolu
5. Vyhodnotíte dáta vzoriek

4.2 Kontroly

Kontrolná DNA XY5 príp. XY1726, ktorá je súčasťou kitu Mentype® **Chimera**® a ďalšie komerčne dostupné DNA reprezentujú tieto alely:

Tabuľka 9. Alely identifikované s Mentype® **Chimera**®

Lokus	Kontrolná DNA XY1726	Kontrolná DNA XY5	ATCC K-562	CCR 9947A	CCR 9948	CCR 3657
Amelogenin	XY	XY	XX	X/X	XY	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

Tabuľka ukazuje alely referenčnej DNA dostupné od ATCC a Coriell Cell Repositories v uvedenom poradí. Týmto sú splnené požiadavky Szibora a kol.(2003).

4.3 Dĺžka fragmentov a alely

Hodnoty dĺžky jednotlivých alelov sú uvedené v tabuľkách 10 až 12. Všetky analýzy boli vykonané na analyzátore ABI PRISM® 3130 s polymérom POP-4® a veľkostným štandardom DNA 550 (BTO). Pri použití iných analyzátorov, DNA štandardov veľkosti alebo polymérov, sa môžu dĺžky fragmentov líšiť.

Vzhľadom na rozdiely špecifické pre zariadenie sa odporúča individuálne nastavenie použitého zariadenia (jemné doladenie) po meraní dĺžky fragmentov.

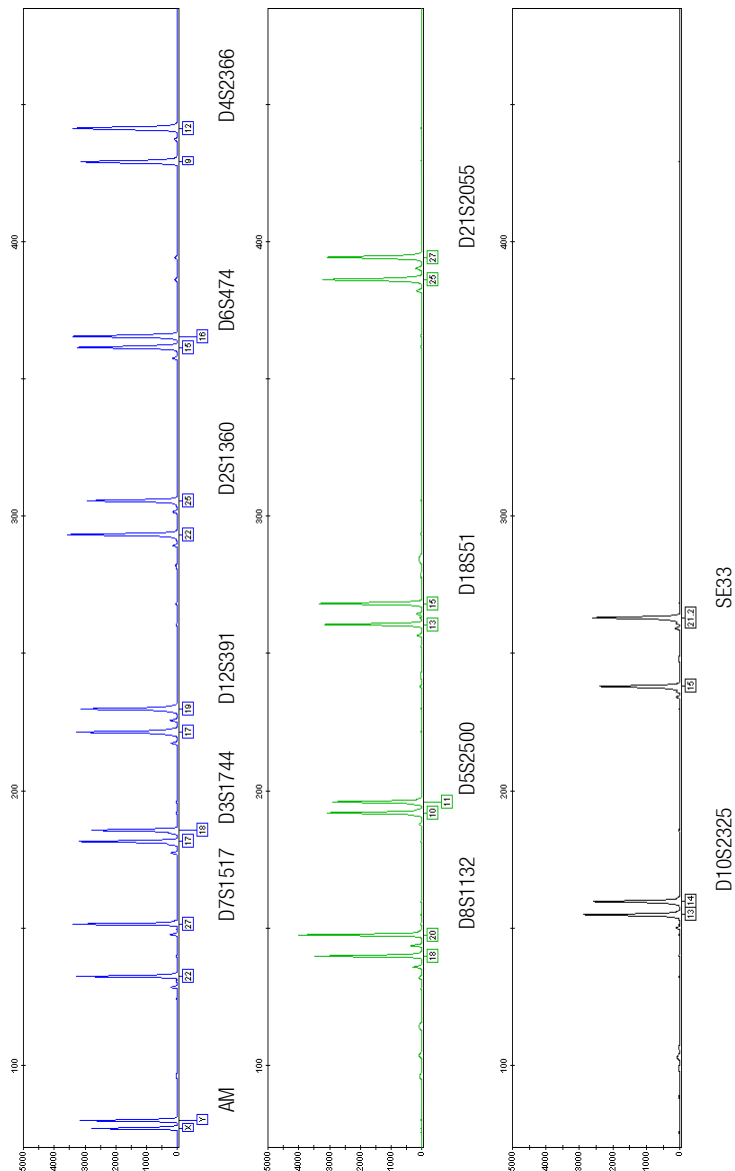
Okrem toho by sa malo vykonať vizuálne porovnanie s alelickým markerom.

Rozsah

Horizontálne: 70-480 bp

Vertikálne: podľa intenzity signálu vzoriek

Obrázok 2A

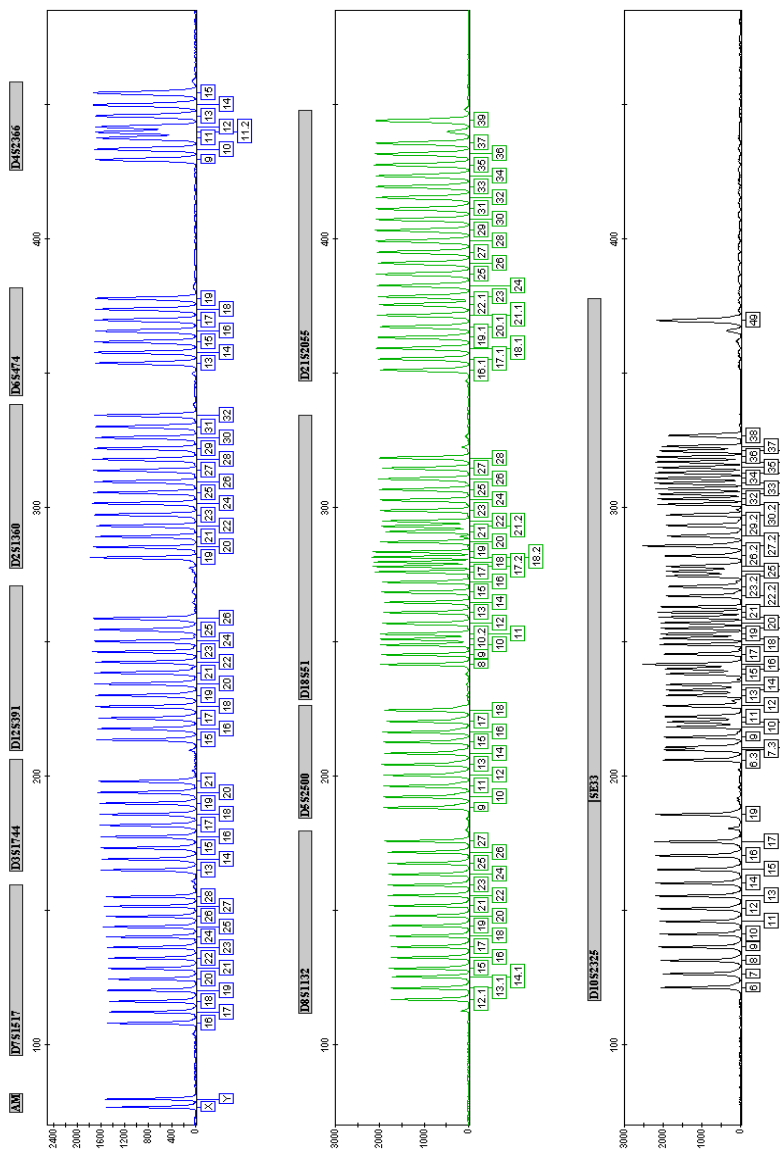


Obr. 2 Elektroferogram Mentype® Chimera® pomocou 500 pg kontrolnej DNA (A) XY5 príp. (B) XY1726. Analýza bola vykonaná na genetickom analyzátoze ABI PRISM® 3130 s DNA Size štandardom 550 (BTO). Priradenie alely bolo vykonané pomocou softwaru GeneMapper® ID a súboru šablónysouborušablony Mentype® Chimera®.

Obrázok 2B



Obrázok 3



Obr. 3 Elektroferogram alelického markera Mentype® **Chimera**®. Analýza prebehla na prístroji ABI PRISM® 3130. Identifikácia alel bola vykonaná pomocou softwaru GeneMapper® ID a s templátovými súbormi Mentype® **Chimera**®.

Tabuľka 10. Dĺžka fragmentov alelického markera Mentype® **Chimera**® meraná na genetickom analyzátoře ABI PRISM® 3130 s POP-4® polymérom(modrý panel)

Marker/ alela	Veľkosť [bp]*	Ďalší alely**	Marker/ alela	Veľkosť [bp]*	Ďalší alely**	Marker/ alela	Veľkosť [bp]*	Ďalší 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				

Tabuľka 11. Dĺžka fragmentov alelického markera Mentype® **Chimera**® meraná na genetickom analyzátoe ABI PRISM® 3130 s POP-4® polymérom (zelený panel)

Marker/ alela	Veľkosť [bp]*	Ďalší alely**	Marker/ alela	Veľkosť [bp]*	Ďalší alely**	Marker/ alela	Veľkosť [bp]*	Ďalší 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							

Tabuľka 12. Dĺžka fragmentov alelického markera Mentype® **Chimera**® meraná na genetickom analyzátoze ABI PRISM® 3130 s POP-4® polymérom (žltý panel)

Marker/ alela	Veľkosť [bp]*	Ďalší alely**	Marker/ alela	Veľkosť [bp]*	Ďalší alely**	Marker/ alela	Veľkosť [bp]*	Ďalší 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				

* Zaokrúhlené na celé čísla

** Tieto „off-ladder“ alely Biotype DNA Pool sú spojené so súčasnými súbormi šablóny Biotype® pre software GeneMapper® ID (ID-X). Ďalšie alely si pozrite okrem iného na adrese http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm

†Tieto alely sú zvýraznené pre lepšiu orientáciu v alelickom markere.

5. Interpretácia výsledkov

Uvedené hodnotenie s automatickým pridelením alelov zabezpečuje presnú a spoľahlivú diferenciaciu alelov.

Výpočet obsahu darcovskej DNA sa môže vykonať priamo z prvotných údajov analýzy fragmentu.

Na porovnanie výsledkov získaných s Mentype® **Chimera**® s cytologickými výsledkami (analýza Fish) sa musí použiť aspoň 500 leukocytov.

„Pull-up Peaks“

„Pull-up Peaks“ sa môžu vyskytnúť, ak sa na analýzu použije nevhodná matrica alebo ak sú výšky píkovo mimo lineárneho detekčného rozsahu prístroja. Objavujú sa v rovnej polohe ako špecifické vrcholy, ale v iných farebných paneloch (zvyčajne s nižšou intenzitou signálu).

„Stutter Peaks“

Výskyt „Stutter Peaks“ závisí od zloženia repetitívnej sekvencie a od počtu alel. Pri tetranukleotidových STR motívoch vedú chyby v Taq DNA polymeráze počas PCR k píkom n-4, tj. píkom je o 4 bázy menší ako skutočná alela. Repetitívne nukleotidy v rámci STR sú pri PCR „preskočené“. Na vyhodnotenie píkovo platí špecifikácia templátového súboru pre software GeneMapper™ ID/ID-X.

Pridanie nukleotidov nezávislé od templátu

Multi Taq DNA polymeráza má kvôli svojej terminálnej transferovej aktivite tendenciu viazať adenosín na 3' -koniec amplifikovaného DNA fragmentu. Ak systém PCR nemá dostatok času na predĺženie alebo ak sekvencia príkladov nezabezpečí predĺženie, toto pripojenie sa neuskutoční. Tento artefakt je identifikovateľný na základe výskytu fragmentu skráteneho o bázu (-1 bp píkom), v porovnaní s očakávaným fragmentom sú navrhnuté tak, aby minimalizovali tvorbu artefaktu. Okrem toho je tvorba artefaktu obmedzená záverečným extenzívnym krokom v protokole PCR (68 °C po dobu 60 minút). Výška píkom artefaktu sa zvyšuje pri vysokých množstvách DNA. Na vyhodnotenie píkovo by si malo každé analytické laboratórium stanoviť vlastné limity.

Artefakty

Teplota v miestnosti môže výrazne ovplyvniť správanie produktov PCR na kapilárnej elektroforéze a môže viesť k výskytu „shoulder peaks“ alebo dvojitých, rozdelených píkovo. Okrem toho môže byť ovplyvnená automatická identifikácia alel. Ak sú pozorované tieto javy, odporúčame novú injekciu vzoriek pri vyššej teplote miestnosti a prípadne použitie viac ako jedného alelického markera na run.

Vplyv typu polyméru

Kit Mentype® **Chimera**® bol validovaný a certifikovaný na použitie polyméru POP-4®. Použitie iného polyméru (napr. POP-7 alebo POP-6) môže ovplyvniť správanie špecifických produktov PCR. Okrem toho sa môže pozorovať zvýšený hluk pozadia v dôsledku zmeneného správania voľných zvyškov fluorescenčného farbiva.

6. Populačno-genetické údaje

Najdôležitejšie populačno-genetické údaje pre každý marker STR sú uvedené v tabuľkách 13-16. Vzorec pre výpočet polymorfného informačného obsahu (PIC) bol publikovaný Botsteinom et al. (1980), Očakávaná heterozygotnosť (HET) Neimem a Roychoudhuryem et al. (1974), Sila diskriminácie (PD) (Jonesom et al. (1972). Všetky vzorce sú vhodné pre autozomálne markery.

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

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

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

Tabuľka 13. Populačné a genetické údaje populácie

Marker D2S1360		Marker D3S1744		Marker D4S2366	
Alela	Frekvencia alely	Alela	Frekvencia alely	Alela	Frekvencia 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				

Tabuľka 14. Populačno-genetické údaje

Marker D5S2500		Marker D6S474		Marker D7S1517	
Alela	Frekvencia alely	Alela	Frekvencia alely	Alela	Frekvencia 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

Tabuľka 15. Populačno-genetické údaje

Marker D8S1132		Marker D10S2325		Marker D12S391	
Alela	Frekvencia alely	Alela	Frekvencia alely	Alela	Frekvencia 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

Tabuľka 16. Populačno-genetické údaje

Marker D18S51		Marker D21S2055		Marker SE33 (ACTBP2)	
Alela	Frekvencia alely	Alela	Frekvencia alely	Alela	Frekvencia 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

Všetky populačné genetické údaje sú založené na štúdiu, ktorú uskutočnila spoločnosť Biotype GmbH na približne 210 nepríbuzných Európanoch.

7. Referencie

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.

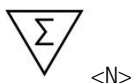
8. Vysvetlenie symbolov



Výrobca



Označenie šarže



Dostatočné pro testy <N>



Odkaz na eIFU



Môže sa použiť do



Teplotné obmedzenie



Číslo objednávky



Diagnostika in vitro



Chráňte pred svetlom



Udržujte v suchu

Špecifikácia kitu Mentype® Chimera®

A Analytická validácia

A a) Stanovenie štandardnej reakcie a tolerancie špecifickej pre dávku

Ciel': Stanovenie štandardnej reakcie a tolerancie špecifickej pre dávku vzhľadom na relatívnu výšku signálu (RFU), vyváženosť výšky signálu multiplexnej PCR a základnú líniu.

Metodika: Testovacia súprava je dodávaná s kontrolnou DNA, ktorá je vo väčšine systémov STR heterozygotná. Štandardná odpoveď bola vykonaná s kontrolnou DNA v nominálnej koncentrácii 500 pg v tetraplikátoch. Pridali sa aj štyri slepé kontroly bez templátovej DNA (NTC).

Výsledok: Na zmiešanie vzoriek PCR z rôznych dávok sa stanovili tieto špecifikácie: Pri použití genetického analyzátoru *ABI PRISM® 310* dosahovali signály hodnoty 1 000 – 4 000 RFU a pri použití genetického analyzátoru *ABI PRISM® 3130* boli výšky signálu v rozmedzí 1 000 – 5 000 RFU. Kolísanie výšky signálov heterozygotných systémov by nemalo prekročiť 30 % smernej hodnoty. Neboli nájdené žiadne nešpecifické signály ≥ 50 RFU pre slepé vzorky.

A b) Testovanie presnosti genotypizácie

Ciel': Presnosť identifikácie alelov je štatisticky overená za štandardných podmienok. Test overuje zhodu výsledkov na vopred genotypovaných vzorkách medzi automatickou identifikáciou alelov pomocou alelického Laddera a priradením alelov inými metódami (iná sada PCR, priame sekvenovanie atď.) pri využití softvéru GeneMapper ID. Na základe výsledkov bolo určené nastavenie prístroja pre daný test genotypizácie kapilárnou gélovou elektroforézou (Bins a Panels). A bol stanovený podiel „stutter“ píkov pre hodnotiace templáty DNA sekvenceru.

Metodika: 80 vopred genotypovaných ľudských DNA z rôznych zdrojov (plnohodnotná krv, výtery tváre) bolo testovaných v samostatných nezávislých reakciách. Okrem toho bola testovaná negatívna kontrola (vzorka bez DNA). Ako akceptačné kritérium boli definované úplné profily píkov s výškou ≥ 50 RFU (manuálne hodnotenie).

Výsledok: Po určení nastavenia prístroja v danom teste bol všetkým vzorkám DNA pridelený správny genotyp pre všetky systémy SRT aj pre amelogenínny marker.

A c) Testovanie analytickej špecifickosti

Cieľ: Štúdiá bola navrhnutá tak, aby vylúčila falošne pozitívne výsledky z dôvodu skříženej reaktivity s vybranými vzorkami DNA neľudského pôvodu. V klinickej praxi však môže byť neľudská DNA z dôvodu sterilného odberu vzoriek do veľkej miery vylúčená.

Metodika: Bolo testované 2,5 ng genomickej DNA z *Bos taurus* (hovädzí dobytok), *Sus scrofa domestica* (prasa domáce), *Canis lupus familiaris* (pes), *Felis catus* (mačka) a *Oryctolagus cuniculus* (domáci králik). DNA zo zvierat pochádzala zo vzoriek krvi, ktoré boli poskytnuté ako zvyšok veterinárneho vyšetrovania.

Výsledok: V oblasti alel (< 200 RFU) sa nenašla žiadna skřížená reaktivita.

A d) Testovanie analytickej citlivosti

Cieľ: Test sa použil na stanovenie limitu analytickej detekcie (citlivosti).

Metodika: Zriad'ovací rad bol testovaný s 500 pg až 31,5 pg referenčnej DNA v tetraplikátoch. Kritériá akceptácie boli definované ako úplné profily DNAs ≥ 200 RFU.

Výsledok: Bol stanovený detekčný limit 200 pg genomickej DNA.

A e) Testovanie rôznych termocyklérov PCR

Cieľ: PCR termocykléry rôznych výrobcov sa líšia svojimi špecifickáciami. Najmä môžu existovať rôzne rýchlosti ohrevu a chladenia, ako aj rôzne techniky regulácie teploty.

Metodika: Testovanie štandardných reakcií pomocou kontrolnej DNA v menovitej koncentrácii 500 ng sa vykonalo týmito termocyklami v tetraplikátoch s rovnakým master mixom a 2 vzorkami NTC bez DNA: Thermocycler *GeneAmp 9700* s hliníkovým blokom (Life Technologies, Applied Biosystems Division Germany GmbH, Darmstadt) okrem toho zariadenie *GeneAmp 9700* so strieborným blokom (Applied Biosystems Germany GmbH, Darmstadt), DNA Engine (PTC-200) termálny cyklér Peltier (Bio-Rad Laboratories GmbH, Mníchov), *Biometra T1* (Biometra GmbH, Göttingen), termálny cyklér *Teche[®] TC-512* (biostep GmbH, Jahnsdorf) a *Eppendorf Mastercycler ep-S* (Eppendorf AG, Hamburg).

Výsledok: Neboli zistené žiadne nešpecifické produkty ≥ 200 RFU. Odchýlka priemerných výšok píku oproti štandardnej reakcii bola 20 % pri definovanom rampingu 2 °C/s, maximálne 20 %.

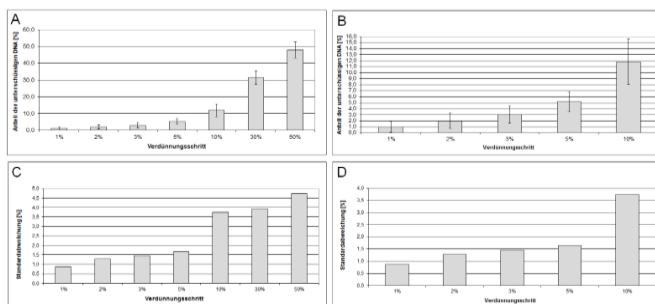
A f) Testovanie rôznych zložených vzoriek DNA

Cieľ: Cieľom analýzy chimerizmu po alogénnej transplantácii kmeňových buniek krvi je detekcia a relatívna kvantifikácia fragmentov DNA darcu a príjemcu. Na zistenie

minimálneho reziduálneho ochorenia by sa malo v zmiešanej vzorke zistiť najnižšie možné množstvo DNA darcu alebo príjemcu.

Metodika: Boli pripravené tri nezávislé zmesi dvoch DNA, pričom chýbajúca DNA bola použitá pri 0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 %. DNA v zmesiach vykazovali aspoň 3 lokusy STR so štyrmi informačnými alelami. V každom prípade sa testoval 1 ng zmesi DNA pri štandardnom reakčnom profile, v štyroch paralelných reakciách. Hodnotili sa signály s výškou min. 50 RFU.

Výsledok: Výsledky sú uvedené na Obrázku 4. Pre deficitnú DNA bolo možné dosiahnuť detekčný limit 1 %. To zodpovedá hodnotám 1-5 % dosiahnutým s forenznými STR súpravami používanými pri analýze chimérizmu.



Obr. 4: Testovanie zmesi DNA (A, B). Priemerné hodnoty a štandardná odchýlka frakcií deficitnej DNA vypočítaná zo signálnych hladín elektroforézy kapilárneho gélu. (C, D) štandardné odchýlky od A a B.

A g) Testovanie vplyvu rôznych teplôt annealingu v PCR

Ciel': Na stanovenie odolnosti PCR sa simuluje kolísanie teploty pre krok hybridizácie príkladov (annealing) 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 v nominálnej koncentrácii 500 pg bola zmenená o ± 1 °C a ± 2 °C. Bola vykonaná trojnásobná analýza s rovnakým master mixom.

Výsledok: Neboli zistené žiadne nešpecifické vedľajšie produkty ≥ 200 RFU pro ± 1 °C. Priemerné výšky píkov sa líšili maximálne o ± 30 % od štandardnej reakcie pri teplote ± 1 °C. Pre ± 2 °C nebola zistená žiadna strata alelického signálu < 200 RFU.

A h) Testovanie rôznych dávok pufrov PCR

Ciel': Pomery koncentrácií medzi zložkami obsiahnutými v pufré PCR reakčnej zmesiA (dNTP, koncentrácia iónov, najmä Mg^{2+}) sú rozhodujúce pre citlivosť, špecifickosť a rovnováhu signálov v multiplexnej PCR. Robustnosť testu sa preto testuje na rôzne dávky dodávaného pufru PCR.

Metodika: Test 3 nezávislých dávok reakčnej zmesi A sa vykonal pri štandardnej reakcii s kontrolnou DNA s nominálnou koncentráciou 500 pg.

Výsledok: Neboli zistené žiadne nešpecifické vedľajšie produkty ≥ 50 RFU. Odchýlka priemerných výšok píku v porovnaní so štandardnou reakciou bola najviac 20 %.

A i) Testovanie inhibítorov PCR

Cieľ: Hematín z hemoglobínu je silný inhibítor Taq DNA polymerázy, ak nie je úplne odstránený pri čistení DNA z plnej krvi.

Metodika: Účinok *Hematin porcine* (Sigma-Aldrich, Freiburg) bol meraný v konečných koncentráciách 0-250 μM v štandardnej reakcii s kontrolnou DNA s nominálnou koncentráciou 500 pg.

Výsledok: Boli dosiahnuté úplné profily (≥ 50 RFU) až do koncentrácie inhibítora 100 μM *Hematin porcine*. Pre konečnú koncentráciu 150 μM už nebolo možné dosiahnuť úplné profily (len čiastočné profily).

A j) Stabilita po otvorení

Cieľ: Po opakovanom zmrazení a odmrazení bola testovaná stabilita činidiel v súprave PCR.

Metodika: Činidlá kitu boli podrobené cyklu dvadsaťnásobného zmrazenia a rozmrazovania. Zmrazenie bolo vykonané minimálne 1 hodinu pri teplote -20 °C. Rozmrazovanie sa uskutočnilo pri teplote miestnosti a činidlo bolo pred použitím homogenizované pretrepaním. Potom sa uskutočnila štandardná reakcia s kontrolnou DNA menovitej koncentrácie 500 pg a doplnkovými slepými vzorkami bez DNA v triplikátoch. Výsledky sa porovnávali so štandardnou reakciou bez cyklu zmrazenia a rozmrazovania.

Výsledok: Odchýlka zistených výšok píkov v porovnaní so štandardnou reakciou bola maximálne 20 % (najmä strata signálu). V prípade slepých vzoriek neboli zistené žiadne ďalšie píky > 50 RFU v rozsahu stupnice.

B **Vyhodnotenie klinických parametrov testu****B a)** **Odber vzoriek, etické a regulačné aspekty**

Bola vykonaná klinická štúdiá hodnotenia výkonu kitu podľa § 20 až § 24 zákona o zdravotníckych pomôckach (DE). Výnimku zo schvaľovacej povinnosti pre lieky s nízkym bezpečnostným rizikom podľa § 7 nariadenia o klinických skúškach liekov udelil Spolkový ústav pre lieky a zdravotnícke pomôcky. K dispozícii bolo kladné hlasovanie príslušnej etickej komisie a vyhlásenie o súhlase pacienta.

Bola použitá heparinizovaná žilová plnohodnotná krv.

B b) **Referenčné metódy**

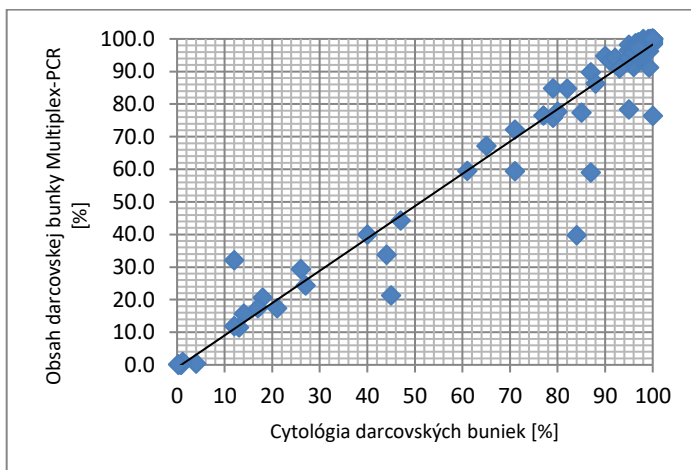
Ako porovnávací test slúžila cytogenetická diferenciácia darcovských a recipientných leukocytov pomocou fluorescenčnej in situ hybridizácie (FISH). Sériová špecifická chromozómová CE-IVD CEP® X Spectrum Orange™ / Y Spectrum Green™ priamo označená fluorescenčnou DNA sondou (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, DE) bola použitá v súlade s pokynmi výrobcu.

B c) **Extrakcia DNA a prečistenie**

Extrakcia DNA z heparinizovanej plnej krvi sa vykonala pomocou QIAamp® DNA Blood Mini (Qiagen GmbH, Hilden, DE) podľa pokynov výrobcov.

B d) **Výsledok**

V rôznych dňoch po transplantácii alogénnych kmeňových buniek krvi alebo kostnej drene bolo zozbieraných celkovo 103 súborov údajov dospelých pacientov. Dvojice darca-príjemca sa líšili v genetickom pohlaví a boli teda vhodné pre FISH špecifický pre pohlavné chromozómy. Na PCR bolo použitých najmenej 1,5 ng genomickej DNA. Najprv boli identifikované všetky informačné systémy STR párov darca-príjemca a pohlavie bolo potvrdené genotypizáciou amelogeného markera, ktorý je súčasťou multiplexných PCR. Na výsledky PCR sa použili priemerné hladiny signálu všetkých informačných STR (aspoň 2). Výsledky porovnávacích testov sú zhrnuté na Obr. 5.



Obr. 5: Konkordantná analýza multiplexnej PCR v porovnaní s cytológiou

V 92 zo 103 sad meraní (90,3%) bol rozdiel v detekcii multiplexnej PCR z cytogenetiky menší ako 5 %. Väčšie odchýlky sa pozorovali len pri cytogenetických nálezoch, kde celkový počet buniek bol 500 alebo menej. Podľa odporúčania výrobcu súpravy FISH by sa malo spočítať najmenej 200 buniek. Podľa praktických odporúčaní však vyšší absolútny počet buniek (500 – 1 000) dáva lepšie cytogenetické výsledky[1, 2].

B e) Referencie

- 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