

Mentype[®] DIPscreen

PCR Amplification Kit

Gebrauchsanweisung (IFU)



0483

In-vitro-Diagnostikum

DISIFU02v1de

05.09.2025



45-12300-0025

45-12300-0100



Charge



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

Website: www.biotype.de

E-Mail: support@biotype.de

Bestellung: sales@biotype.de

Änderungshinweis

Bitte beachten Sie die folgenden Anpassungen gegenüber der vorherigen IFU-Version:

Dokumentnummer	Änderungen	Datum
DISIFU02v1de	Initiale Version	21.03.2025
DISIFU02v2de	Ergänzung zum Umgang mit Interferenzen im Kapitel Nutzungsbeschränkungen	05.09.2025

Eine gedruckte Version dieser IFU kann innerhalb von 7 Tagen kostenlos zur Verfügung gestellt werden.

Für diese oder andere Anfragen kontaktieren Sie uns bitte unter:

+49 351 8838 400 oder support@biotyper.de

Inhalt

Zweckbestimmung	4
Wissenschaftlicher Hintergrund	4
Beschreibung des Produkts	5
Mitgelieferte Materialien	7
Kitinhalt.....	7
Beschreibung der Reagenzien.....	8
Reagenzienlagerung und -handhabung	9
Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien	9
Allgemeine Laborausstattung.....	9
Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterial.....	10
Geräte und Software	11
Probenmaterial	12
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen.....	13
Hinweis für den Nutzer	14
Verfahren	15
Überblick über den experimentellen Arbeitsablauf	15
Probenvorbereitung.....	15
Anforderungen an das Ausgangsmaterial	15
DNA-Extraktion	16
DNA-Quantifizierung und Verdünnung	17
DNA Lagerung.....	17
Vorbereitung der Kontrollproben	18
Positivkontrolle PC	18
No Template Kontrolle NTC	18
Mastermix Ansatz.....	18
PCR-Amplifikation	20
Kapillargelelektrophorese.....	22
Vorbereitung der PCR-Produkte	22

Analyse der Fragmentlänge	23
Datenanalyse	26
Allgemeines Verfahren für die Datenanalyse.....	26
Ablauf der Laufvalidierung	27
DNA Size Standard 550 (BTO).....	27
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder	28
Control DNA XY82 (PC)	28
No Template Kontrolle NTC	29
Probenanalyse	30
Ablauf der Datenanalyse	30
Qualitative Analyse - Identifizierung von informativen Loci	31
Semi-quantitative Analyse - Chimärismusanalyse	31
Datenanalyse mit ChimerisMonitor IVD	33
Datenanalyse mit GeneMapper™ ID-X	35
Vorbereitung der GeneMapper™ ID-X-Software	35
Troubleshooting.....	39
Leistungsbewertung.....	41
Klinische Leistungsdaten	51
Qualitätskontrolle	54
Technische Unterstützung.....	54
Referenzen.....	54
Nutzungsbeschränkungen.....	55
Informationen zur Bestellung	56
Markenzeichen und Haftungsausschlüsse	57
Erläuterung von Symbolen	58
Anhang.....	60

Zweckbestimmung

Das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ist ein manueller Assay zur Analyse genomischer DNA extrahiert aus peripheren venösen Vollblutproben von erwachsenen Leukämiepatienten, welche sich einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (allo-HSCT) unterzogen haben.

Das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit weist 33 Deletions-Insertions-Polymorphismen (DIP) und Amelogenin in einer Multiplex-PCR-Reaktion nach. Vor der HSCT werden diese Polymorphismen zum qualitativen Screening der Genotypen von Patient und Spender und zur Identifizierung patientenspezifischer DIP-Allele verwendet. Diese informativen Allele werden analysiert, um nach der allo-HSCT eine semi-quantitative Chimärismusüberwachung durchzuführen.

Das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ist für professionelle Laboranwender bestimmt, die in molekulargenetischen Techniken, Multiplex-PCR und in der Handhabung mit Genanalysatoren von Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems™) geschult sind.

Wissenschaftlicher Hintergrund

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSCT) ist eine Behandlungsoption zur Heilung von Patienten mit nicht-malignen und malignen hämatologischen Erkrankungen, wie z. B. Leukämie. Mit Hilfe der Chimärismusanalyse wird die Mischung aus hämatopoetischen Zellen des Spenders und des Empfängers bei allo-HSCT-Empfängern bestimmt, um frühe Anzeichen einer Transplantatabstoßung zu erkennen. Humanes peripheres Venenblut wird für die Genotypisierung und Überwachung verwendet. Gemäß den CLSI-Richtlinien (MM05-A2 2nd Edition) werden für die Blutentnahme Antikoagulanzen wie EDTA und Citrat empfohlen. Je nach Erfolg der Transplantation können sich verschiedene Formen des hämatopoetischen Chimärismus (vollständig, gemischt oder Verlust) entwickeln. Für die Chimärismusanalyse werden verschiedene Verfahren eingesetzt, darunter die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), der Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP), die Blutbildanalyse und PCR-basierte Methoden. Die Analyse von Insertions-Deletions-

Polymorphismen (INDEL oder DIPs) ermöglicht eine semiquantitative Chimärismusanalyse mit Multiplex-PCR-Ansätzen sowie den Wechsel auf quantitative Methoden im Verlauf mit allelspezifischen Applikationen auf qPCR- oder dPCR-Plattformen. DIP-Analysen sind demnach die Voraussetzung für ein sensitives und flexibles Chimärismusmonitoring. Um frühe Anzeichen einer Transplantatabstoßung zu erkennen, sollte die Chimärismusanalyse in regelmäßigen Abständen und kurz nach der allo-HSCT durchgeführt werden.

Beschreibung des Produkts

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ist ein Multiplex-PCR Kit, das für die Chimärismusüberwachung entwickelt wurde. Zur Spender-Empfänger-Diskriminierung werden biallelische Insertions-Deletions-Polymorphismen (INDEL oder DIPs) mit einer sehr hohen Heterozygotierate und einer ausgewogenen Allelverteilung über 19 Chromosomen (siehe Tabelle1) gleichzeitig in einer einzigen PCR-Reaktion amplifiziert. Ein Primer für jeden Locus ist mit dem Fluorophor 6-FAM™, BTG oder BTY markiert. Die PCR-Produkte werden anschließend durch Kapillargel-Elektrophorese analysiert.

Tabelle1 Locus-spezifische Informationen des Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, HLD = Human Locus DIP, -DIP = Deletion, +DIP = Insertion

DIP-Lokus	Chromosomale Kartierung	DIP-Lokus
FAM-Panel		
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	-/AGGTGTCGAACAACACATGATAC
HLD112	17p12	-/TTGTA
HLD307	Xp11.23	-/TCAACCAA
HLD310	2p22.3	-/GTCTGGGTT
HLD110	16q22.1	-/TCCCTG
HLD133	3p22.1	-/CAACCTGGATT
HLD79	7q31.2	-/AATCT
HLD105	14q24.3	-/ATAGACAA
HLD140	3q23	-/GGTAGTATGGGCCT

DIP-Lokus	Chromosomale Kartierung	DIP-Lokus
HLD163	12q24.31	-/AACTACGGCAGCCCC
BTG-Panel		
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	-/ATTAAATA
HLD134	5q11.2	-/ATGATGGTTCCTCAGA
HLD305	20q11.22	- /CAAGGTCCCACCACACTCGCGTGGGA
BTY-Panel		
HLD48	2q11.2	-/GACTT
HLD114	17p13.2	-/TCCTATTCTACTCTGAAT
HLD304	9q34.3	-/GAGCTGCTCAAGAGAGAGG
HLD131	7q36.2	-/TTGGGCTTATT
HLD38	1q32.2	-/TAGTT
HLD82	7q21.3	-/ACCTCCTACTCCTTGGTCTATTCTG GTCACATGTA

Der Test wurde durch eine Chimärismusanalyse von über 200 HLA-verwandten Spender-Empfänger-Paaren validiert und seine Eignung wurde in einer vergleichenden klinischen Studie bestätigt.

Die Nachweisgrenze für die qualitative Analyse liegt bei 125 pg genomischer DNA.

Der Inputbereich für den Nachweis von gemischtem Chimärismus unter Standardbedingungen beträgt 1,0 - 2,0 ng gDNA. Der optimale gDNA-Input beträgt 2 ng unter Standardbedingungen.

Eine Sensitivität von 1,4 % LoD₉₅ (Limit of Detection) kann mit 2 ng gDNA als Input für die Analyse informativer Marker erreicht werden. Um diese Sensitivität zu erreichen, wird empfohlen, so viele informative Marker wie möglich zu verwenden.

Mitgelieferte Materialien

Kitinhalt

Tabelle 2 Inhalt des Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit

Reagenz	Farbe der Kappe	Volumen pro Verpackungsgröße	
		25 Rkt.	100 Rkt.
Nuclease-Free Water	Hellblau	1,5 mL	2 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Lila	125 µL	500 µL
Mentype® DIPscreen Primer Mix	Rot	125 µL	500 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Weiß	15 µL	60 µL
Control DNA XY82 (2 ng/µL)	Weiß	10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Orange	13 µL	50 µL
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder	Grün	25 µL	25 µL

Eine Übersicht über die Chargennummern der Komponenten finden Sie auf dem Etikett, das sich auf der Innenseite der Kitbox befindet.

HINWEIS

i

Bitte beachten Sie, dass die Verpackungsgröße die Anzahl der Testungen beschreibt, **ohne** die Anzahl der erforderlichen Kontrollen oder den erforderlichen Überschuss zum Pipettieren zu berücksichtigen

Wir empfehlen die folgende Größe für den entsprechenden Durchsatz zu verwenden:

- < 8 Proben pro PCR-Lauf: 25 Reaktionen Packungsgröße
- ≥ 8 Proben pro PCR-Lauf: 100 Reaktionen Packungsgröße

Beschreibung der Reagenzien

Nuclease-Free Water (nuklease-freies Wasser): Wasser in PCR-Qualität, das im PCR-Setup und als No-Template Kontrolle (NTC) verwendet wird.

Reaction Mix A (Reaktionsgemisch A): PCR-Puffer mit dNTPs und MgCl₂. Der PCR-Puffer ist optimiert, um die Enzymaktivität für die PCR zu fördern.

Mentype® DIPscreen Primer Mix (Primergemisch): Multiplex-Oligonukleotid-Primer-Mix mit markierten Primern (Markierung: 6-FAM™, BTG, BTY) und unmarkierten Primern.

Multi Taq 2 DNA Polymerase: Hotstart Taq DNA Polymerase, 2,5 U/μL.

Control DNA XY82 (2 ng/μL) (Kontroll-DNA): genomische DNA, isoliert aus EDTA-Blut einer männlichen Person. Die DNA wird als qualitative, externe Positivkontrolle verwendet.

HINWEIS



Die Control DNA XY82 ist für den Labormitarbeiter unbedenklich, da sie aus einzelnen gereinigten DNA-Molekülen besteht, die ungefährlich sind und keine aktiven biologischen Funktionen haben. Sie enthält keine lebenden Zellen oder pathogene Organismen, die eine direkte Bedrohung darstellen könnten.

DNA Size Standard 550 (BTO) (DNA-Längenstandard): Mischung aus fluoreszenzmarkierten PCR-Fragmenten mit definierten Fragmentlängen zwischen 60 - 550 bp, die Komponente wird jedem PCR-Produkt vor der Fragmentlängenanalyse zugegeben, sie wird für eine Größenregression zur genauen Bestimmung der Fragmentlänge der PCR-Produkte verwendet.

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder (Allelleiter): Mischung aus artifiziellen PCR-Produkten, die alle mit dem Assay nachgewiesenen Allele repräsentieren und als Genotypisierungsreferenz für die genaue Allelidentifizierung dienen.

Reagenzienlagerung und -handhabung

Das Kit wird auf Trockeneis versandt. Die Komponenten des Kits sollten im gefrorenen Zustand ankommen, mit Ausnahme der Multi Taq 2 DNA Polymerase. Diese ist in einem Puffer gelagert ist, der ein Einfrieren des Reagenz verhindert.

Bitte überprüfen Sie die Vollständigkeit des Kits bei Erhalt. Verwenden Sie keine Kits, die bei der Ankunft aufgetaut sind. Wenn eine oder mehrere Komponenten nicht gefroren sind oder wenn die Röhrchen oder die Verpackung während des Transports beschädigt wurden, kann die Leistung nicht garantiert werden.

Lagern Sie alle Komponenten lichtgeschützt bei -25 °C bis -15 °C. Insbesondere der Mentype® DIPscreen Primer Mix, der DNA Size Standard 550 (BTO) und die Mentype® DIPscreen Allelic Ladder müssen lichtgeschützt gelagert werden.

Um Kontaminationen zu vermeiden, empfehlen wir, die Prä-PCR Templates (DNA-Proben, Control DNA XY82) und die Post-PCR Komponenten (DNA Size Standard 550 (BTO) und Mentype® DIPscreen Allelic Ladder) getrennt von den PCR-Reagenzien (Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A und Mentype® DIPscreen Primer Mix) zu lagern und zu verwenden.

Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett der Kitbox angegeben oder 12 Monate nach dem Öffnen (je nachdem welcher Zeitpunkt zuerst eintritt). Überschreiten Sie nicht die Höchstzahl von 20 Frieren-Tauen-Zyklen.

Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien

Allgemeine Laborausstattung

- Tischzentrifuge mit einem Rotor für 2 mL und 200 µL Reaktionsgefäße
- Zentrifuge mit einem Rotor für Mikrotiterplatten für 96-Well-Reaktionsplatten
- Vortex-Mischer
- Kalibrierte, einstellbare Pipetten mit aerosoldichten Einweg-Filterspitzen

- Geeignete 200 µL 96-Well-Reaktionsplatten oder 200 µL-Reaktionsgefäße mit entsprechendem Verschlussmaterial, PCR-Qualität
- Geeignete Gestelle für 2 mL und 200 µL Reaktionsgefäße
- Kühlgestell geeignet für 2 mL Röhrchen
- Puderfreie Einweghandschuhe
- NanoDrop™ One Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) oder Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific)

HINWEIS



Alle für die PCR verwendeten Materialien sollten von angemessener Qualität sein (DNA-frei und für die Molekularbiologie geeignet). Bitte stellen Sie sicher, dass alle verwendeten Geräte gemäß den Anweisungen und Empfehlungen des Herstellers installiert, kalibriert, überprüft und gewartet wurden.

Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterial

Tabelle3 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Reagenzien

Reagenz	Anbieter	Bestellnummer
Matrix Standard BT5 multi (25 µL)	BIOTYPE GmbH	45-15100-0025
Matrix Standard BT5 multi (2 x 25 µL)	BIOTYPE GmbH	45-15100-0050
ChimerisMonitor IVD	BIOTYPE GmbH	46-14800-0000
QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (IVD)	Qiagen	61104
NucleoSpin® DX Blood (IVD)	Macherey-Nagel	740899.50
Hi-Di™ Formamid, 25 mL	Thermo Fisher Scientific	4311320
POP-4™ Polymer für 3500/3500xL Genetic Analyzer (384 Proben)	Thermo Fisher Scientific	4393715

Reagenz	Anbieter	Bestellnummer
POP-7™ Polymer für 3500/3500xL Genetic Analyzer (384 Proben)	Thermo Fisher Scientific	4393708
Anode Buffer Container (ABC) Serie 3500	Thermo Fisher Scientific	4393927
Cathode Buffer Container (CBC) Serie 3500	Thermo Fisher Scientific	4408256
3500 Genetic Analyzer 8 Capillary Array 36 cm	Thermo Fisher Scientific	4404683
3500 Genetic Analyzer 8 Capillary Array 50 cm	Thermo Fisher Scientific	4404685

Geräte und Software

Das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit wurde für die Verwendung mit den folgenden PCR-Cyclern validiert:

- ProFlex PCR System (Best.-Nr.: 4484073 (3 x 32 Well Block), 4484075 (96-Well Block), Thermo Fisher Scientific)
- GeneAmp® PCR System 9700 Silver (abgekündigt, Best.-Nr. N805-0200, Thermo Fisher Scientific)
- Mastercycler nexus gradient (Best.-Nr.: 6331000017, Eppendorf AG)
- Biometra Tadvanced (Best.-Nr.: 846-2-070-214, Analytik Jena)

Für die Durchführung des Tests ist nur eines der oben aufgeführten Geräte erforderlich.

Die Verwendung von anderen als den oben genannten Geräten muss vom Benutzer validiert werden. Die folgenden Spezifikationen müssen erfüllt werden:

- Beheizter Deckel
- Block geeignet für 200 µL PCR-Platten/-Gefäße
- Heiz- und Kühlrate einstellbar auf 4 - 5 °C/s

Das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit wurde für die Verwendung mit den folgenden Geräten und Einstellungen validiert:

- Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), Software-Version 4.0.1

- POP-4™ Polymer für den 3500/3500xL Genetic Analyzer
- POP-7™ Polymer für den 3500/3500xL Genetic Analyzer
- 3500 Genetic Analyzer 8 Capillary Array 36 cm
- 3500 Genetic Analyzer 8 Capillary Array 50 cm

Das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit wurde für die Verwendung mit den folgenden Softwares validiert. Für die Datenanalyse und -evaluation ist nur eine der unten aufgeführten Softwares erforderlich. Eine manuelle Auswertung der fsa-Dateien oder Ergebnisse, die mit der Data Collection Software des Analysegerätes generiert wurden, ohne eine der beiden beschriebenen Softwareoptionen zu nutzen, ist nicht validiert.

- ChimerisMonitor IVD, Version 3.0.x (BIOTYPE GmbH)
- GeneMapper™ ID-X Software, Version 1.6 (Thermo Fisher Scientific), unter Verwendung produktspezifischer:
 - AnalysisMethod: DIPscreenIVD_Analysis4_v1x oder DIPscreenIVD_Analysis7_v1x
 - Bin: DIPscreenIVD_Bins4_v1x oder DIPscreenIVD_Bins7_v1x
 - Panel: DIPscreenIVD_Panel4_v1x oder DIPscreenIVD_Panel7_v1x
 - Size Standard: BTO_60-550_v1x

HINWEIS



Vergewissern Sie sich, dass alle verwendeten Geräte gemäß den Anweisungen und Empfehlungen des Herstellers installiert, kalibriert, überprüft und gewartet wurden.

Probenmaterial

Die folgenden Proben wurden mit dem Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit validiert:

- Genomische DNA, isoliert aus menschlichem peripherem venösem Vollblut (EDTA, Citrat, Heparin) zur Überwachung und Genotypisierung. Die isolierte gDNA ist unverdünnt bei -25 °C bis -15 °C zu lagern.

HINWEIS



Vergewissern Sie sich, dass das für die Blutentnahme verwendete Antikoagulans mit den Anweisungen des Herstellers des DNA-Isolierungskits kompatibel ist.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Lesen Sie die Gebrauchsanweisung sorgfältig durch bevor Sie das Produkt verwenden.
- Lesen Sie die Sicherheitsdatenblätter (SDS) und Non-Hazardous Statements (NHS) für alle BIOTYPE-Produkte. Diese senden wir Ihnen auf Anfrage zu bzw. stehen sie auf unserer Homepage zum Download bereit (www.biotype.de/sicherheitsdatenblatter). Für Produkte, die keinen besonders besorgniserregenden Stoff enthalten oder anderen Beschränkungen der Verordnung 1272/2008 (CLP) unterliegen und entsprechend kein SDS benötigen, stellt BIOTYPE das SDS auf Anfrage zur Verfügung.
- Bitte wenden Sie sich an die jeweiligen Hersteller, um Kopien der Sicherheitsdatenblätter für zusätzlich benötigte Reagenzien zu erhalten.
- Kitkomponenten verschiedener Kitchargen dürfen nicht gemischt werden.
- Die Aliquotierung der Kitkomponenten in andere Reaktionsgefäße ist nicht zulässig.
- Die Verwendung dieses Produkts ist auf professionelle Laboranwender beschränkt, die in molekulargenetischen Techniken, Multiplex-PCR und in der Handhabung mit Genanalysatoren von Thermo Fisher Scientific geschult sind.
- Überprüfen Sie das Produkt und seine Bestandteile vor dem ersten Gebrauch auf:
 - Unversehrtheit
 - Vollständigkeit in Bezug auf Anzahl, Art und Füllung (siehe Kapitel Mitgelieferte Materialien)
 - Korrekte Etikettierung
 - Zustand bei Ankunft (alle Komponenten gefroren, außer Multi Taq 2 DNA Polymerase)

- Proben sollten immer als infektiös und/oder biologisch gefährlich sowie in Übereinstimmung mit sicheren Laborverfahren und guter Laborpraxis behandelt werden.
- Verwenden Sie kein Kit, dessen Ablaufdatum überschritten ist.
- Entsorgen Sie die Proben und Kitabfall gemäß den örtlichen Sicherheitsvorschriften.
- Alle verwendeten Instrumente müssen gemäß den Anweisungen und Empfehlungen des Herstellers installiert, kalibriert, überprüft und gewartet worden sein.

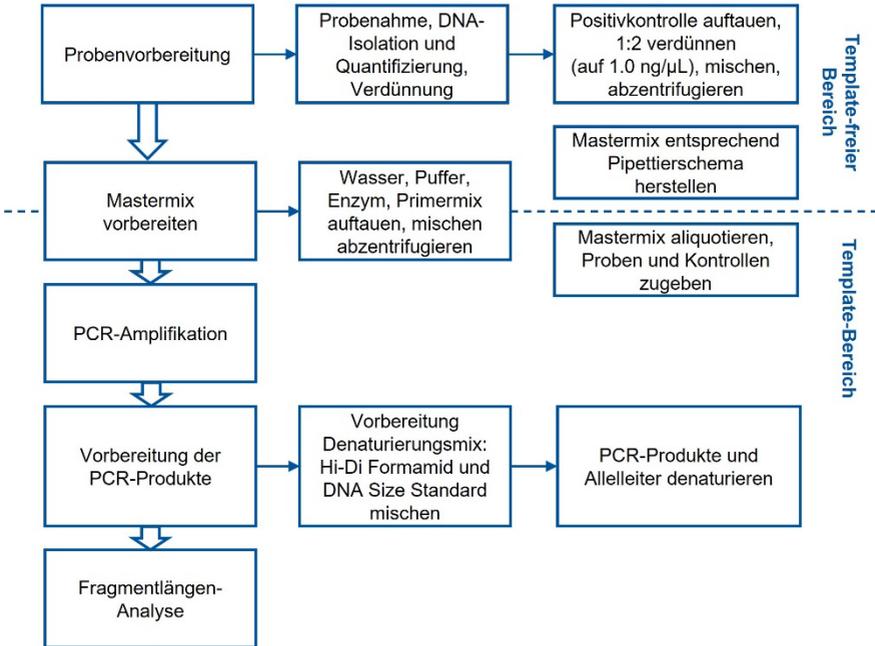
Hinweis für den Nutzer

Jedes Problem, das im Zusammenhang mit dem Produkt auftritt, ist dem Hersteller vom Anwender zu melden. Alle schwerwiegenden Zwischenfälle im Zusammenhang mit diesem Kit müssen dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates, in dem der Anwender und/oder der Patient ansässig ist, gemeldet werden.

Eine Zusammenfassung der Sicherheit und Leistung (Summary of Safety and Performance, SSP) wird gemäß Artikel 29 der Verordnung (EU) 2017/746 erstellt und soll den vorgesehenen Anwendern, im Falle dieses Produkts ausschließlich Laborspezialisten, den öffentlichen Zugang zu einer aktualisierten Zusammenfassung der Daten über die Sicherheit und Leistung des Produkts über die EUDAMED-Datenbank verschaffen.

Verfahren

Überblick über den experimentellen Arbeitsablauf



Probenvorbereitung

Anforderungen an das Ausgangsmaterial

Entnehmen Sie mindestens 200 µL peripheres venöses Vollblut für das folgende Verfahren. Die Handhabung des Ausgangsmaterials (peripheres venöses Vollblut) sollte den Empfehlungen der Leitlinie MM05-A2 (2. Auflage) des *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) entsprechen: Vollblut kann bei Raumtemperatur (22 °C bis 25 °C) bis zu 24 Stunden oder bei 2 °C bis 6 °C für 72 Stunden oder länger gelagert werden kann. Außerdem wird empfohlen, für die Vollblutentnahme EDTA, Citrat oder Heparin als Antikoagulanzen zu verwenden.

HINWEIS



Eine lange Lagerung des Rohprobenmaterials kann zu einer Fragmentierung des genetischen Materials und damit zu einer unzureichenden Qualität führen. Dies kann das Analyseergebnis verschlechtern, z. B. durch unvollständige Profile.

DNA-Extraktion

Führen Sie die DNA-Extraktion und -Aufreinigung aus peripheren venösen Vollblutproben gemäß den Anweisungen des Herstellers durch. Die folgenden Kits wurden im Rahmen der Leistungsbewertung des Produkts überprüft:

- QIAamp® DSP DNA Blut Mini Kit
- Macherey-Nagel NucleoSpin® Dx Blood, CE-zertifiziertes Mini Kit für DNA aus Blut

HINWEIS



Eine Blutkontamination kann in der PCR-Reaktion oder in der isolierten DNA durch eine orangefarbene Färbung erkannt werden. Wenn eine Farbveränderung beobachtet wird, empfehlen wir, die DNA-Isolierung zu wiederholen, um eine mögliche Interferenz zu vermeiden.

HINWEIS



Achten Sie darauf, dass alle Spuren von Ethanol vor der Elution der Nukleinsäure entfernt werden. Ethanol ist ein starker Inhibitor der PCR.

DNA-Quantifizierung und Verdünnung

Bestimmen Sie die DNA-Konzentration durch UV/VIS-Spektroskopie bei 260 nm mit dem NanoDrop-Spektrophotometer oder durch Fluoreszenzspektroskopie mit dem Qubit™ Fluorometer.

Verwenden Sie bei der Spektralphotometrie den Elutionspuffer aus dem DNA-Extraktionskit, um den Blank zu messen. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} sollte im Bereich von 1,7 - 1,9 liegen, während das Verhältnis A_{260}/A_{230} im Bereich von 1,8 - 2,3 liegen sollte.

Für die fluorometrische Quantifizierung der DNA kann das Qubit™ Fluorometer entweder mit dem Qubit 1x dsDNA HS Assay-Kit oder dem Qubit dsDNA BR Kit verwendet werden.

Für die Verwendung mit dem Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit verdünnen Sie die DNA-Proben auf eine optimale Konzentration von 2,0 ng/μL. Bereiten Sie die Verdünnung vor der Verwendung frisch zu. Verwenden Sie nuklease-freies Wasser als Verdünnungsmittel.

HINWEIS

i

Der Inputbereich für das Kit liegt bei 0,125 - 2,0 ng DNA pro Reaktion, der **optimale Input ist 2 ng DNA** pro Reaktion unter Standardbedingungen für höchste Sensitivität. Ein Input unter 0,125 ng kann zu unvollständigen Profilen führen, ein höherer Input kann zu Pull-up-Peaks führen.

DNA Lagerung

Die DNA sollte unverdünnt bei -25 °C bis -15 °C für die Langzeitlagerung oder gemäß den Angaben des Herstellers des DNA-Isolierungskits gelagert werden.

Vorbereitung der Kontrollproben

Positivkontrolle PC

Tauen Sie die Control DNA XY82 auf, homogenisieren Sie sie durch Vortexen, gefolgt von einer kurzen Zentrifugation.

Verdünnen Sie die Control DNA XY82 1:2 von 2,0 ng/μL auf 1,0 ng/μL mit dem Nuclease-Free Water.

Homogenisieren Sie die verdünnte PC durch kurzes Vortexen und anschließendes kurzes zentrifugieren (ca. 10 s). Lagern Sie die verdünnte Positivkontrolle nicht.

HINWEIS



Verwenden Sie immer eine frisch hergestellte Verdünnung der Control DNA XY82.

No Template Kontrolle NTC

Verwenden Sie das im Kit enthaltene Nuclease-Free Water als No-Template Kontrolle (NTC) anstelle einer Probe.

Mastermix Ansatz

Entfernen Sie die folgenden Komponenten aus dem Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit für das Master Mix Setup:

- Nuclease-Free Water (hellblauer Deckel)
- Reaction Mix A (violetter Deckel)
- Mentype® DIPscreen Primer Mix (roter Deckel)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (weißer Deckel)

Alle gefrorenen Komponenten werden bei Raumtemperatur (22 °C bis 28 °C, ca. 30 min, lichtgeschützt) aufgetaut und durch Umdrehen der Röhren oder leichtes Vortexen homogenisiert. Danach werden die Reagenzien kurz zentrifugiert (ca. 10 s). Um die Grundsätzen der guten Laborpraxis einzuhalten, ist es ratsam, die Multi Taq 2 DNA Polymerase vor der

Herstellung des Mastermixes so lange wie möglich in einer gekühlten Umgebung (z. B. auf einer Kühlvorrichtung) aufzubewahren.

HINWEIS

Mischen Sie die Multi Taq 2 DNA Polymerase durch Schwenken, um eine längere Stabilität zu erreichen - **vortexen Sie das Enzym nicht.**

Bereiten Sie den PCR-Mastermix gemäß Tabelle 4 in einem PCR-Gefäß geeigneter Größe für die Gesamtzahl der zu testenden Proben in einem dafür vorgesehenen sauberen Bereich zu. Beziehen Sie mindestens eine PC und eine NTC in Ihre Berechnung pro Lauf ein.

HINWEIS

Als Richtwert gilt: Wenn Sie weniger als 10 Proben testen, verwenden Sie genug Mastermix für eine zusätzliche Probe. Wenn Sie 10 oder mehr Proben testen, verwenden Sie ein überschüssiges Mastermixvolumen von + 10 %.

Tabelle 4 PCR Mastermix Ansatz, * Das Volumen hängt von der DNA-Konzentration ab. Wenn ein höheres Volumen an DNA-Template verwendet wird, muss das Volumen des Nuclease-Free Water angepasst werden. Das Gesamtreaktionsvolumen pro Reaktion (Rkt.) muss immer 25,0 µL betragen.

Komponente	Volumen je Reaktionsanzahl		
	1 Rkt.	5 Rkt.	10 Rkt.
Nuclease-Free Water*	13,4 µL	67,5 µL	134,0 µL
Reaction Mix A	5,0 µL	25,0 µL	50,0 µL
Mentype® DIPscreen Primer Mix	5,0 µL	25,0 µL	50,0 µL
Multi Taq 2 DNA-Polymerase	0,6 µL	2,4 µL	6,0 µL
DNA-Template oder Kontrollprobe	1,0 µL*	5 x 1,0 µL*	10 x 1,0 µL*
Gesamtvolumen	25,0 µL	125,0 µL	250,0 µL

Mischen Sie den Mastermix durch leichtes Vortexen und zentrifugieren Sie die Mischung anschließend kurz.

Aliquotieren Sie 24,0 µL des PCR-Mastermixes in vorbereitete 200 µL PCR-Gefäße und zentrifugieren Sie die geschlossenen Gefäße kurz.

Anwendung von DNA-Templates und Kontrollen

Geben Sie 1,0 µL der folgenden Probenarten in die vorbereiteten PCR-Gefäße mit dem PCR-Mastermix.

NTC: 1,0 µL Nuclease-Free Water anstelle einer Probe hinzufügen.

Probe: 1,0 µL der vorbereiteten, verdünnten gDNA-Proben (2,0 ng/µL) hinzufügen.

PC: 1,0 µL der vorbereiteten, 1:2 verdünnten Control DNA XY82 (1,0 ng/µL) anstelle einer Probe hinzufügen.

HINWEIS



Bereiten Sie zuerst die NTC vor, um Kontaminationen der Kontrolle zu vermeiden. Bereiten Sie die PC zuletzt vor, um Kreuzkontaminationen der Proben zu vermeiden.

HINWEIS



Verwenden Sie pro Lauf mindestens eine Positivkontrolle (PC) und eine No Template Kontrolle (NTC). Andernfalls kann der Lauf nicht validiert werden.

Alle PCR-Röhrchen verschließen, vorsichtig vortexen und abzentrifugieren.

PCR-Amplifikation

Programmieren Sie den PCR-Cycler mit dem folgenden Programm und stellen Sie die Heiz- und Kühlraten (Ramping) auf 4 - 5 °C/s ein. Führen Sie eine "Hot Start"-PCR durch, um die Polymerase zu aktivieren und die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte zu verhindern.

Tabelle 5 PCR-Protokoll

Temperatur	Zeit	
94 °C	4 min	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	28 Zyklen
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	halten

HINWEIS

Bei Thermocyclern soll das **Ramping auf 4 - 5 °C/s** eingestellt werden, um eine optimale Signalbalance zu gewährleisten.

HINWEIS

Grundlegende Informationen zur Einrichtung, Programmierung und Wartung der verschiedenen PCR-Geräte entnehmen Sie bitte dem Benutzerhandbuch des jeweiligen Geräts.

HINWEIS

Sehr geringe DNA-Mengen können zu statistischen Ausfällen und Disbalance der Peaks führen. Eine Erhöhung der Anzahl der PCR-Zyklen erhöht das Risiko einer Kreuzkontamination durch minimale Mengen an Verunreinigungen. Außerdem könnten unspezifische Amplifikationsprodukte auftreten.

Kapillargelelektrophorese

Vorbereitung der PCR-Produkte

Nach Abschluss der PCR nehmen Sie die Proben aus dem Cycler und zentrifugieren sie kurz.

HINWEIS



Nach Abschluss der PCR können die PCR-Produkte bis zu 4 Wochen bei 2 °C bis 8 °C oder langfristig bei -25 °C bis -15 °C lichtgeschützt gelagert werden.

Tauen Sie folgende Reagenzien auf, gefolgt von leichtem vortexen und zentrifugieren:

- Hi-Di™ Formamid (nicht im Kit enthalten)
- Mentype® DIPscreen Allelic Ladder (grüner Deckel)
- DNA Size Standard BTO (550) (orangener Deckel)

Bereiten Sie den Denaturierungsmix wie in Tabelle 6 beschrieben vor und fügen Sie eine oder zwei Reaktionen hinzu, um Pipettierschwankungen auszugleichen. Rechnen Sie eine zusätzliche Reaktion für die Allelleiter ein.

Tabelle 6 Denaturierungsmischung

Komponente	Volumen pro Reaktion
Hi-Di™ Formamid	12,0 µL
DNA Size Standard BTO (550)	0,5 µL

Pipettieren Sie 12,0 µL der Denaturierungsmischung in die Wells einer PCR-Platte (geeignet für die Verwendung im Genetic Analyzer).

Geben Sie entweder 1,0 µL PCR-Produkt oder 1,0 µL Mentype® DIPscreen Allelic Ladder in die Wells hinzu. Die PCR-Platte mit einer geeigneten Folie verschließen, vortexen und die Platte kurz zentrifugieren.

HINWEIS



Die Allelleiter wird verwendet, um die bei der Datenanalyse analysierten Fragmente korrekt zu bestimmen. In jedem Fragmentlängenanalyselauf muss die Allelleiter mindestens einmal analysiert werden, um eine erfolgreiche Datenauswertung zu gewährleisten.

HINWEIS



Die Kapillaren des Gelelektrophoresegeräts dürfen niemals trocken laufen. Wenn die Proben nicht alle Kapillarpositionen besetzen, füllen Sie die zusätzlichen Wells der Platte mit 12,0 µL Hi-Di™ Formamid entsprechend der Kapillaranzahl.

Denaturieren Sie die vorbereiteten PCR-Produkte auf einem PCR-Cycler für 3 Minuten bei 95 °C und kühlen Sie die Proben anschließend im Cycler auf 4 °C ab. Zentrifugieren Sie die Proben vor der Fragmentlängenanalyse kurz ab.

Analyse der Fragmentlänge

Vor der ersten Fragmentlängenanalyse wird mit dem Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE GmbH) ein spektraler Abgleich der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe für das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit (6-FAM™, BTG, BTY, BTO) durchgeführt.

HINWEIS



Nutzen Sie für die Installation des Matrix Standard BT5 multi dessen Gebrauchsanweisung. Diese ist unter www.biotype.de/ifus oder auf Anfrage über support@biotype.de bei der BIOTYPE GmbH erhältlich.

Nachdem Vorbereitung des Analysegerätes mit dem Matrix Standard BT5 multi erfolgreich durchgeführt wurde, importieren Sie die bereitgestellten Geräteprotokolle für den 3500 Series Genetic Analyzer wie in Tabelle 7 beschrieben (www.biotype.de/template-files).

Tabelle 7 Bereitgestellte Dateien für den 3500 Genetic Analyzer
(www.biotype.de/template-files)

3500 Series Genetic Analyzer	
Instrument Protocol	<u>POP-4™, 36 cm Kapillararray:</u> DIPscreenIVD_Instrument436.xml <u>POP-7™, 50 cm Kapillararray:</u> DIPscreenIVD_Instrument750.xml
Size Standard Protocol	BTO_60-550_SizeStandard.xml
Sizecalling Protocol	BTO_60-550_Sizecalling.xml
Assay	<u>POP-4™, 36 cm Kapillararray:</u> DIPscreenIVD_Assay436.xml <u>POP-7™, 50 cm Kapillararray:</u> DIPscreenIVD_Assay750.xml

Die Spezifikationen für das erforderliche Geräteprotokoll sind in Tabelle 8 beschrieben. Nur die beschriebenen Parameter sollten angepasst werden, die anderen Parameter sollten in der Standardeinstellung bleiben. Befolgen Sie die Gebrauchsanweisung des Herstellers um die spezifischen Betriebsparameter einzustellen.

Tabelle 8 Parameter für die Laufmodule der verschiedenen Kapillargel-Elektrophoresegeräte

	Injection Voltage [kV]	Injection Time [s]	Run Voltage [kV]	Run Time [s]
3500 Series Genetic Analyzer	3.0	8	36 cm Kapillararray: 15	1560
			50 cm Kapillararray: 19.5	

Abweichend von den Werten in Tabelle 8 kann die Laufzeit je nach Länge des verwendeten Kapillararrays angepasst werden, aber es ist zwingend erforderlich, alle Fragmente (60 - 550 bp) des DNA Size Standard 550 (BTO) zu analysieren.

Um ein Protokoll für den Größenstandard einzurichten, müssen dem orangen Panel die folgenden Größen für den DNA Size Standard 550 (BTO) zugewiesen werden:

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 und 550 bp.

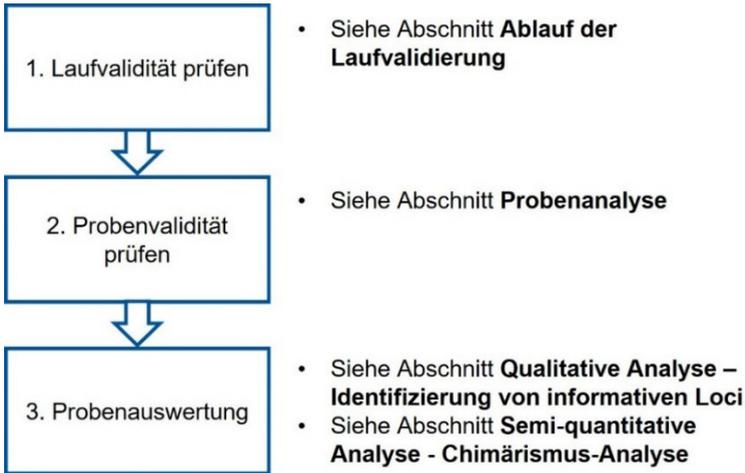
HINWEIS



Die BIOTYPE GmbH stellt spezifische Templates für die einfache Installation spezifischer Laufeinstellungen für die Fragmentlängenanalyse sowie Analysetemplates für ein einfaches Software-Setup von GeneMapper™ ID-X zur Verfügung. Diese Vorlagen stehen zum Download bereit unter: www.biotype.de/template-files

Datenanalyse

Allgemeines Verfahren für die Datenanalyse

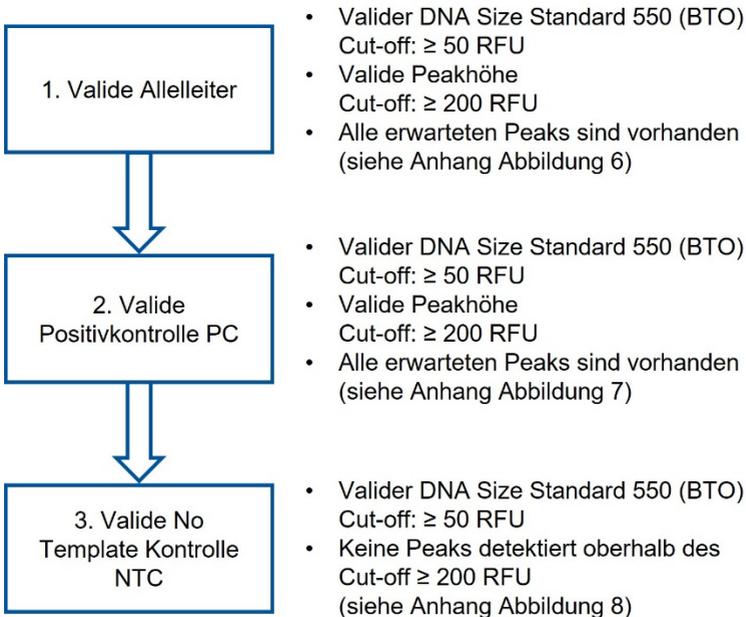


HINWEIS



Die Datenanalyse muss entweder mit der ChimerisMonitor IVD Software oder der GeneMapper™ ID-X Software (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt werden. Eine manuelle Auswertung der fsa-Dateien oder Ergebnisse, die mit der Data Collection Software des Gerätes generiert wurden, ohne eine der beiden beschriebenen Softwareoptionen zu nutzen, ist nicht validiert.

Ablauf der Laufvalidierung



HINWEIS



Zur Beurteilung der Validität sollte der Messbereich 50 - 560 bp analysiert werden.

DNA Size Standard 550 (BTO)

Die Ermittlung der genauen Länge der amplifizierten Produkte hängt vom Gerätetyp, den Elektrophoresebedingungen und dem verwendeten DNA-Größenstandard ab. Aufgrund der Komplexität einiger Loci sollte die Größenbestimmung auf gleichmäßig verteilten Referenzen beruhen.

Überprüfen Sie den DNA Size Standard 550 (BTO) in allen Proben auf die folgenden Kriterien:

- Vorhandensein aller Fragmente bei: **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 und 550 bp**

- Alle Fragmente sind mit Peakhöhen über dem Cut-off ≥ 50 RFU vorhanden
- Bestimmungsmaß $R^2 > 0,995$.
- Die Peakhöhe der Fragmente nimmt mit zunehmender Fragmentlänge nicht kontinuierlich ab.

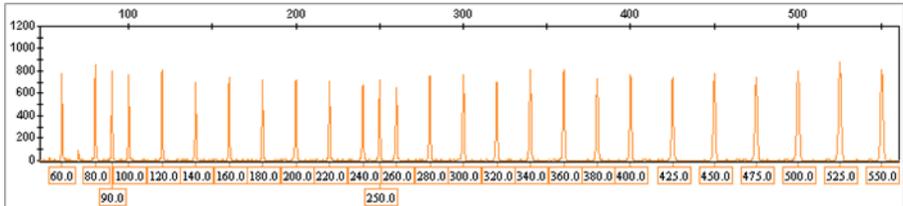


Abbildung 1 Elektropherogramm des DNA Size Standard 550 (BTO), Fragmente mit Längen in bp

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder

Nachdem der Größenstandard validiert wurde, ist zu prüfen, ob alle in der Allelleiter verfügbaren Peaks mit Höhen über dem Cut-off ≥ 200 RFU vorhanden sind.

HINWEIS



Die Mentype® DIPscreen Allelic Ladder enthält Fragmente für jedes nachweisbare Allel. Bitte vergleichen Sie die Allele mit Anhang [Tabelle 20](#) und [Abbildung 5](#).

Control DNA XY82 (PC)

Nachdem Sie den Größenstandard validiert haben, stellen Sie sicher, dass ein vollständiges DNA-Profil aller spezifischen Peaks für die PC mit Höhen ≥ 200 RFU vorhanden ist (siehe [Tabelle 9](#)). Bei der Control DNA XY82 handelt es sich um eine qualitative PCR-Kontrolle, um die Leistung der PCR im Allgemeinen sicherzustellen.

Die Control DNA XY82 (siehe Anhang [Abbildung 6](#)) als Teil des Testkits repräsentiert die folgenden Allele:

Tabelle 9 Genotyp der Control DNA XY82, - = Deletion, + = Insertion

Locus	Control DNA XY82	Locus	Control DNA XY82
FAM-Panel (blauer Kanal)		BTG-Panel (grüner Kanal)	
Amelogenin	X/Y	HLD91	+/+
HLD106	+/+	HLD23	-/+
HLD70	-/+	HLD88	+/+
HLD84	+/+	HLD101	-/+
HLD103	-/+	HLD67	-/+
HLD104	-/+	HLD301	-/+
HLD116	-/+	HLD53	+/+
HLD112	-/+	HLD97	-/+
HLD307	+/+	HLD152	-/+
HLD310	-/+	HLD128	-/+
HLD110	-/+	HLD134	+/+
HLD133	-/+	HLD305	+/+
HLD79	+/+	BTY-Panel (gelber Kanal)	
HLD105	-/-	HLD48	-/-
HLD140	-/+	HLD114	-/-
HLD163	-/+	HLD304	-/+
		HLD131	+/+
		HLD38	+/+
		HLD82	+/+

No Template Kontrolle NTC

Nachdem Sie den Größenstandard validiert haben, prüfen Sie, dass im Bin-Bereichs der NTC keine Peaks über dem Cut-off ≥ 200 RFU detektiert werden (siehe Anhang [Abbildung 6](#))

HINWEIS

Wenn Sie ChimerisMonitor IVD oder GeneMapper™ ID-X zusammen mit den mitgelieferten Vorlagedateien für die Analysemethode verwenden, werden Peaks < 200 RFU automatisch nicht mit dem Allelnamen versehen, was Ihnen die Auswertung der Ergebnisse erleichtert.

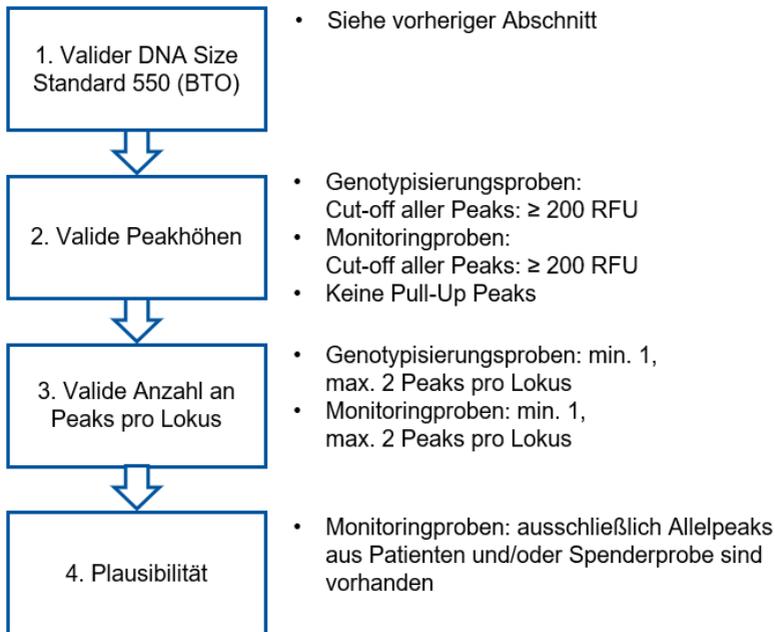
HINWEIS



Artefakte wie kleine Dyeblobs können innerhalb der NTC verstärkt auftreten. Aufgrund der breiten Peakbasis, der abnormalen Peakform und der fehlenden Peakzuordnung ist eine Unterscheidung von Amplikonpeaks möglich.

Probenanalyse

Ablauf der Datenanalyse



Mit der Software ChimerisMonitor IVD werden die beschriebenen Validierungsschritte für den Lauf und die Proben automatisch durchgeführt.

Mit der GeneMapper™ ID-X Software und den spezifischen Templates der BIOTYPE GmbH wird die Basisvalidierung automatisch durchgeführt.

Qualitative Analyse - Identifizierung von informativen Loci

Im folgenden Abschnitt wird die Identifizierung und Differenzierung von empfängerspezifischen Loci erläutert. Daher werden spenderspezifische Loci als nicht-informativ definiert. Die Identifizierung informativer Loci erfolgt anhand der Daten von Empfänger und Spender vor der Transplantation. Beispiele siehe Tabelle 21 –Tabelle 22 im Anhang.

Mit der Software ChimerisMonitor IVD wird die Identifizierung von informativen Loci automatisiert unterstützt.

Informative Loci: Ein Allel in der Empfängerprobe kann in der Spenderprobe nicht nachgewiesen werden.

Nicht-informative Loci: Loci, bei denen sich der/die empfängerspezifische(n) Peak(s) mit dem/den spenderspezifischen Peak(s) überschneiden, oder spenderspezifische Loci.

Semi-quantitative Analyse - Chimärismusanalyse

Die semiquantitative Chimärismusanalyse und zugrunde liegende Berechnungen werden in der Literatur beschrieben, z. B. Clark et al. (2015) [1] oder Nollet et al. (2001) [2]. Die Formeln für die Quantifizierung hängen von der Allelkonstellation im Locus ab und sind in der folgenden in Tabelle 10 (angepasst von Clark et al.2015) dargestellt. Der Chimärismuswert wird für jeden zuvor ausgewählten informativen Locus berechnet. Anschließend wird der Mittelwert aller lokusspezifischen Chimärismuswerte berechnet.

HINWEIS



Die Auswertung der einzelnen SD_{Marker} wird empfohlen, um Ausreißer zu identifizieren. Die SD_{Marker} für Proben mit geringem gemischtem Chimärismus ($< 5\% \text{ MC}$) sollte 4% nicht überschreiten. Bei mittlerem bis hohem gemischtem Chimärismus ($> 5\% \text{ MC}$) sollte die SD_{Marker} 10% nicht überschreiten. Wenn die SD_{Marker} die Grenzwerte überschreitet, wird empfohlen, die MC-Werte der ausgewählten Marker erneut ohne Ausreißer zu analysieren.

Tabelle 10 Semi-quantitative Chimärismusanalyse (nach Clark et al. [1])

Szenario 1	Szenario 2
<p>keine gemeinsamen Allele: Empfänger ist homozygot, Spender ist homozygot, es werden keine Peaks geteilt</p>	<p>ein gemeinsames Allel (homozygot): Empfänger ist heterozygot, Spender ist homozygot, ein Peak wird geteilt</p>
<p>Empfängeranteil:</p> $\% \text{Chimärismus} = \frac{A}{A+B} \times 100 \%$	<p>Empfängeranteil:</p> $\% \text{Chimärismus} = \frac{A}{\left(\frac{B-A}{2}\right) + A} \times 100\%$

Datenanalyse mit ChimerisMonitor IVD

ChimerisMonitor IVD ist eine fortschrittliche Software für eine automatisierte Datenanalyse, Laufauswertung und Chimärismusberechnung. Das integrierte Patientenmanagementsystem ermöglicht die Überwachung der Chimärismuskinetik in hochauflösenden Berichten, aber auch in Diagrammen und tabellarischer Visualisierung.

Allgemeine Anweisungen zur Probenanalyse finden Sie in der Gebrauchsanweisung der ChimerisMonitor IVD-Software.

Alle erforderlichen Analysevorlagen sind in der Testkitverwaltung der ChimerisMonitor IVD enthalten. Diese enthalten sowohl Analysemethoden als auch verknüpfte Bin- und Panel-Vorlagen. Die Software führt während des Lauf-Imports eine allgemeine, integrierte Laufauswertung gemäß dem Abschnitt Ablauf der Datenanalyse durch. Für eine allgemeine Beschreibung des Ablaufes der Datenanalyse mit ChimerisMonitor IVD siehe Tabelle 11.

HINWEIS



Die Datenanalyse muss entweder mit der ChimerisMonitor IVD Software oder der GeneMapper™ ID-X Software (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt werden. Eine manuelle Auswertung der fsa-Dateien oder Ergebnisse, die mit der Data Collection Software des Gerätes generiert wurden, ohne eine der beiden beschriebenen Software-Optionen zu nutzen, ist nicht validiert.

Tabelle 11 Arbeitsablauf der Chimärismusanalyse mit ChimerisMonitor IVD

Nr.	Icon	Arbeitsschritt
1		Probenimport
		Neuen Patienten anlegen. Eine Datenbank mit allen angelegten Patienten wird in der Patientenverwaltung aufgeführt.
		Batch-Import. <ul style="list-style-type: none"> - Wählen Sie das Testkit Biotype Mentype DIPscreen Alle Cut-offs für die korrekte Durchführung und Probenauswertung sind mit der jeweiligen Analysemethode verknüpft.

Nr.	Icon	Arbeitsschritt
	 	<ul style="list-style-type: none"> - Importieren Sie einen Lauf, der die fsa-Dateien der Alleleiter, der positiven Kontrolle, der No Template Kontrolle und der Proben enthält. - Proben typen manuell auswählen (wichtig für die korrekte Peakzuordnung und Chimärismusberechnung) - Die allgemeine Lauf- und Probenauswertung wird von der Software durchgeführt <p>Öffnen Sie die Batch Import Verwaltung</p> <p>CE Probe zuweisen: Wählen Sie eine Probe aus und ordnen Sie sie dem Patienten zu</p>
2	  	<p>Kontrollen prüfen - ChimerisMonitor führt eine integrierte Qualitätsbewertung sowie eine Lauf- und Probenbewertung durch</p> <p>Überprüfen Sie das Alleleiter-Elektropherogramm und die Size Calling Regression</p> <p>Mögliche Qualitätswarnungen werden angezeigt:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Auswertung von Alleleitern beim Lauf-Import innerhalb der Registerkarte - Auf der Registerkarte FSA Import Fehler und Warnungen im Patienteneditor <p>Überprüfen Sie das Elektropherogramm der Positivkontrolle und der Positivkontrolle Size Calling Regression</p> <p>Die Auswertung von Positiv- und No Template Kontrolle während des Lauf-Imports zeigt mögliche Qualitätswarnungen an.</p> <p>Überprüfen Sie das Elektropherogramm No Template Kontrolle und die No Template Kontrolle Size Calling Regression</p> <p>Die Auswertung von Positiv- und No Template Kontrolle während des Batch-Imports zeigt mögliche Qualitätswarnungen an</p>
3	 	<p>Probenbewertung</p> <p>Überprüfen Sie das Proben-Elektropherogramm</p> <p>Eine korrekte Peakzuordnung ist für eine genaue Definition informativer Marker und eine solide Chimärismusberechnung unerlässlich.</p> <p>Die Probenqualitätsprüfung während des Lauf-Imports zeigt mögliche Qualitätswarnungen an</p> <p>Überprüfung des Größenstandardregression der Probe.</p> <p>Die Probenqualitätsprüfung während des Lauf-Imports zeigt mögliche Qualitätswarnungen an</p>
4		Definition von informativen Markern

Nr.	Icon	Arbeitsschritt
		Neue Transplantation anlegen: Vordefinierte Marker können für die Patientenüberwachung ausgewählt werden
5		Chimärismusanalyse
		Chimärismus berechnen: Vorausgewählte Marker für die Chimärismusanalyse werden angezeigt und der Chimärismus wird berechnet (Einzelmarker-Chimärismus, Gesamtchimärismus und Standardabweichung)
6		Report
		Report erstellen: Einzelwerte und Chimärismuskinetik werden im Zeitverlauf angezeigt (Tabelle und Grafik, Dateiformat pdf oder csv)
7		Aufbau eines datenbankgestützten Systems für die Patientenverwaltung

Datenanalyse mit GeneMapper™ ID-X

Vorbereitung der GeneMapper™ ID-X-Software

Allgemeine Hinweise zur Anwendung und Probenanalyse finden Sie im Benutzerhandbuch der GeneMapper™ ID-X Software.

Die Allelzuordnung soll mit der Analysesoftware GeneMapper™ ID-X in Kombination mit den Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit Template Files der BIOTYPE GmbH durchgeführt werden. Die BIOTYPE-Templates (siehe Tabelle 12) sind auf unserer Homepage (www.biotype.de/template-files) als Download oder auf Anfrage über support@biotype.de erhältlich. Der Arbeitsablauf der Chimärismus-Analyse mit der GeneMapper™ ID-X Software ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 12 BIOTYPE GmbH Vorlagen für GeneMapper™ ID-X Software,
Vorlagen speziell für # POP-4™ oder § POP-7™ Anwendung

Template	Name des Templates	
Panels*	DIPscreenIVD_Panel4_v1x# DIPscreenIVD_Panel7_v1x§	oder höher
Bin Set*	DIPscreenIVD_Bins4_v1x# DIPscreenIVD_Bins7_v1x§	oder höher
Size Standard*	BTO_60-550_v1x	oder höher
Analysis Method*	DIPscreenIVD_Analysis4_v1x# DIPscreenIVD_Analysis7_v1x§	oder höher
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Tabelle für 2 Allele Tabelle für 10 Allele	

*Diese Templates müssen immer für die Datenanalyse verwendet werden. Die anderen Template-dateien sind optional.

HINWEIS

i

Der Import und die Allelzurodnung mit bereitgestellten Template-dateien ist nur gewährleistet, wenn die GeneMapper™ ID-X Software verwendet wird. Wenn die GeneMapper™ Software verwendet wird, können bei einigen Template-dateien Importprobleme auftreten. Möglicherweise müssen Sie die Panels und Bins mit einem oder mehreren Durchläufen der Allelleiter an Ihr spezifisches Geräte-Setup anpassen. Kontaktieren Sie uns für Unterstützung (support@biotype.de).

Tabelle 13 Arbeitsablauf der Chimärismus-Analyse mit GeneMapper™ ID-X

Nr.	Icon	Arbeitsschritt										
1		Software-Vorbereitung										
		Panel Manager Importieren Sie die mitgelieferten Templatedateien für Panel, Bins										
		GeneMapper™ ID-X Manager Importieren Sie die mitgelieferten Templates für Analysemethode und Größenstandard										
2		Probenimport										
		Add Samples to Project (Proben zum Projekt hinzufügen) - Durchsuchen Sie den Laufordner, wählen Sie ihn aus und Add to List → Add										
3		Probenanalyse										
		Markieren Sie die folgenden Eigenschaften in den entsprechenden Spalten des Probenblatts und wählen Sie Analyze .										
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Spaltenname</th> <th>Wählen Sie</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sample Typ</td> <td>Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control oder Sample</td> </tr> <tr> <td>Analysis Method</td> <td>Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE GmbH Template DIPscreenIVD_Auswertung_v1x</td> </tr> <tr> <td>Panel</td> <td>Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE GmbH Template DIPscreenIVD_Panel_v1x</td> </tr> <tr> <td>Size Standard</td> <td>Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE GmbH Template BTO_60-550_v1x</td> </tr> </tbody> </table>	Spaltenname	Wählen Sie	Sample Typ	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control oder Sample	Analysis Method	Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE GmbH Template DIPscreenIVD_Auswertung_v1x	Panel	Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE GmbH Template DIPscreenIVD_Panel_v1x	Size Standard	Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE GmbH Template BTO_60-550_v1x
Spaltenname	Wählen Sie											
Sample Typ	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control oder Sample											
Analysis Method	Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE GmbH Template DIPscreenIVD_Auswertung_v1x											
Panel	Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE GmbH Template DIPscreenIVD_Panel_v1x											
Size Standard	Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE GmbH Template BTO_60-550_v1x											
4		Kontrollen überprüfen										
		Überprüfung der Validität der Kontrollen (Allelleiter, Positivkontrolle, No Template Kontrolle)										
		Bei ausreichenden Peakhöhen erfolgt die Zuordnung gemäß den Angaben in der Analysemethode										
5		Probenbewertung										

Nr.	Icon	Arbeitsschritt
		Prüfen Sie die Validität der Probe.
		Bei ausreichenden Peakhöhen erfolgt die Zuordnung gemäß den Angaben in der Analysemethode
		Wenn Peaks nicht zugeordnet werden, obwohl ausreichende Höhen erreicht werden, ist eine manuelle Zuordnung möglich. Bitte prüfen Sie alle Peakzuordnungen auf Plausibilität.
6		Definition von informativen Markern
		Vergleichen Sie die Genotypen des Empfängers und des Spenders und identifizieren Sie dann manuell informative Marker (siehe Anhang, Beispiele für die qualitative Bewertung von loci)
7		Chimärismusanalyse
		Exportieren Sie die Sizing Table und berechnen Sie die Chimärismuswerte gemäß der Tabelle 10 - siehe Kapitel Semi-quantitative Analyse - Chimärismusanalyse ist

HINWEIS

i Unter Verwendung der mitgelieferten Tenplatedateien für die Analysemethode, Bins und Panels und der Auswahl des entsprechenden Probenotyps wird die Gültigkeit dieser Proben von der Software automatisch überprüft. Die Qualitätskontrollflags SOS (Sample off-Scale), SQ (Sizing Quality), OMR (Outside Marker Range) müssen bei bestandener Validität grün hinterlegt sein.

ARNM	SOS	SQ	SSPK	MIX	OMR	CGQ
<input checked="" type="checkbox"/>						

HINWEIS

i Verwenden Sie den Size Match Editor in GeneMapper™ ID-X, um den Größenstandard zu bewerten. Wenn ein automatisches Fragment-Calling fehlgeschlagen ist, können die Triplets 80 / 90 / 100 bp und 240 / 250 / 260 bp für eine Orientierung bei der manuellen Peakzuweisung verwendet werden.

Troubleshooting

Die Post-PCR-Analyse und automatische Allelzuordnung mit geeigneter Analysesoftware gewährleistet eine präzise und zuverlässige Unterscheidung der Allele. Eine automatische Berechnung des Verhältnisses zwischen Spender- und Empfänger-DNA sowie der Standardabweichungen und Nachweisgrenzen kann direkt aus den Rohdaten einer Fragmentlängenanalyse gewonnen werden. Wenn Ergebnisse, die mit dem Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit erzielt wurden, mit Ergebnissen aus zytologischen Analysen abgeglichen werden sollen, muss sichergestellt werden, dass die zytologischen Analysen mit mindestens 200 Leukozyten durchgeführt wurden.

Pull-up-Peaks

Pull-up-Peaks können auftreten, wenn die Peakhöhen außerhalb des linearen Detektionsbereichs liegen oder wenn eine falsche Matrix verwendet wurde. Sie können an den Positionen bestimmter Peaks in anderen Farbpanels auftreten, typischerweise mit niedrigeren Signalintensitäten. Bei regelmäßiger Beobachtung sollten Sie die Matrixgenerierung wiederholen und auf zu hohen DNA-Input prüfen.

Template-unabhängige Addition von Nukleotiden

Aufgrund ihrer terminalen Transferase-Aktivität neigt die Multi Taq 2 DNA Polymerase dazu, ein Adenosin-Radikal an das 3'-Ende der amplifizierten DNA-Fragmente anzuhängen. Der Artefaktpeak ist eine Base kürzer als erwartet (-1 bp Peaks). Alle BIOTYPE-Primer sind so konzipiert, dass diese Artefakte minimiert werden. Die Artefaktbildung wird durch den abschließenden Extensionsschritt des PCR-Protokolls bei 68 °C für 60 min weiter reduziert. Die Peakhöhe des Artefakts korreliert mit der DNA-Menge. Die Laboratorien sollten ihre individuellen Grenzwerte für die Analyse der Peaks festlegen.

Artefakte

Die Raumtemperatur kann das Laufverhalten von PCR-Produkten auf Multikapillargeräten beeinflussen und es können Schulterpeaks oder Split-Peaks auftreten. Außerdem kann die automatische Zuordnung in einigen Fällen beeinflusst werden. Wenn diese Effekte auftreten, empfehlen wir, die Probe bei einer höheren Raumtemperatur erneut zu injizieren und eventuell mehr als eine Allelleiterprobe pro Lauf zu verwenden.

Artefakte wie dye blobs können ebenfalls in den Proben und noch deutlicher in der NTC auftreten. Aufgrund der breiten Peakbasis, der abnormalen Peakform und der fehlenden Peakzuordnung ist eine Unterscheidung von Amplikonpeaks möglich.

Pipettiergenauigkeiten

Die Robustheitsanalyse des Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kits hat gezeigt, dass das Kit gegenüber geringfügigen Abweichungen vom beschriebenen Protokoll (+/- 10 % Abweichung) robust ist. Eine mittlere Abweichung (+/- 20 %) vom beschriebenen Protokoll kann für die Analyse von gemischtem Chimärismus kritischer sein (insbesondere bei niedrigen Chimärismusanteilen). Besonderes Augenmerk ist auf den Reaction Mix A zu legen. Eine Abweichung von -20 % beim Pipettieren dieses Puffers kann zu einer erheblichen Verringerung der Signalhöhe oder sogar zu nicht nachweisbaren Markern führen. Um etwaige Abweichungen zu minimieren, empfehlen wir die Verwendung kalibrierter Pipetten, präzises Pipettieren und gründliches Mischen.

Ausreißer

Die Auswertung der Standardabweichung innerhalb der Marker (SD_{Marker}) wird empfohlen, um Ausreißer zu identifizieren. Wenn die SD_{Marker} für Proben mit geringem gemischtem Chimärismus (< 5 % MC) 4 % und für Proben mit mittlerem bis hohem gemischtem Chimärismus (> 5 % MC) 10 % übersteigt, sollte eine erneute Analyse der MC-Werte ohne diesen spezifischen Ausreißer in Betracht gezogen werden.

Einfluss der Polymere

Das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit wurde für die Analyse auf POP-4™ und POP-7™ Polymer validiert und zertifiziert.

Bei Verwendung des Polymers POP-7™ können im vorderen Teil der Elektropherogramme dye blobs auftreten. Insbesondere wurden dye blobs bis zu einer Größe von 110 bp im blauen Kanal beobachtet, die den HLD106-Locus beeinträchtigen könnten. Überprüfen Sie die Elektropherogramme auf solche Effekte, bevor Sie die Chimärismusanalyse durchführen.

Die Verwendung anderer Polymere (z. B. POP-6™) könnte das Laufverhalten bestimmter PCR-Produkte beeinflussen. Außerdem kann sich das Hintergrundrauschen durch das unterschiedliche Verhalten freier Fluoreszenzfarbstoffe erhöhen.

Leistungsbewertung

Analytische Spezifität

Die automatische Allelzuweisung mit der Allelleiter und die Konkordanz der Allelzuordnung im Vergleich zur Vortypisierung der Test-DNAs mittels anderer Methoden (andere PCR-Kits) wurde unter Verwendung der Genemapper™ ID-X Software getestet.

Es wurden einundachtzig vorcharakterisierte DNA-Proben mit dem Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit untersucht. Vollständige Profile mit Peakhöhen ≥ 200 RFU konnten detektiert. Nach Bestimmung der testspezifischen Geräteeinstellungen konnten allen DNA-Proben für alle DIP-Systeme und den Amelogenin-Marker der korrekte Genotyp zugeordnet werden. Zusätzlich wurde die Primerspezifität des Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kits untersucht. Es wurden keine unspezifischen, fehlgeprägten PCR-Produkte beobachtet, was die Primerspezifität des Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kits bestätigt.

Interferenzen und Kreuzreaktionen

Potenzielle Störfaktoren, die die Ergebnisse des Messverfahrens beeinflussen könnten, wurden in Übereinstimmung mit den Empfehlungen der CLSI-Leitlinien EP07 (3. Auflage), EP37 (1. Auflage) bewertet. Für das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit wurden die endogenen und exogenen Interferenzen bestimmt, deren maximal zu erwartende Konzentration (C_{max}) in der PCR-Reaktion gemäß den Richtlinien getestet und bei Auftreten von Interferenzen weitere Konzentrationen getestet, bei der keine Interferenz mehr nachweisbar ist.

Die Ergebnisse zeigten eine störende Wirkung des endogenen Interferenzen Blut, das mit $2,57 \times 10^{-3} \%$ v/v in der PCR-Reaktion getestet wurde. Hierbei konnten Auswirkungen auf die Vollständigkeit des Profils der Einzelgenotyp-DNA beobachtet werden. Darüber hinaus wurden Abweichungen von der unbehandelten Gruppe bei den gemischten Chimärismusproben beobachtet, die mit 2 %, 5 % und 30 % MC gemessen wurden. Die Ergebnisse lagen außerhalb der Genauigkeitsgrenzen und zeigten somit eine Störung der PCR-Reaktion. Eine Blutkontamination kann jedoch in der

PCR-Reaktion oder in der isolierten DNA-Suspension durch eine orangefarbene Färbung erkannt werden. Geschulte Labormitarbeiter sollten beobachten, ob eine Farbveränderung vorliegt, und die DNA-Isolierung wiederholen, um jegliche Interferenz zu vermeiden.

Bei den exogenen Interferenzen zeigten EDTA, Natriumcitrat, Ethanol, Acetylsalicylsäure, Metoclopramid und Cyclosporin keine störenden Auswirkungen bei den jeweiligen C_{max} . Ein vollständiges Profil der Einzelgenotyp-DNA XY1726 konnte gezeigt werden. Die Abweichungen von der unbehandelten Gruppe, die für die gemischten Chimärismus-Proben bei 2 %, 5 % und 30 % MC beobachtet wurden, lagen innerhalb der Genauigkeitsgrenzen.

Bei den exogenen Störfaktoren Heparin, Proteinase K und Methotrexat wurde eine Interferenz bei dem von CLSI EP37 (1. Auflage) empfohlenen C_{max} beobachtet. Weitere Verdünnungen wurden getestet, bis keine Interferenz mehr nachweisbar war. Bei Heparin $2,36 \times 10^{-2}$ mg/dL, bei Proteinase K $3,22 \times 10^{-6}$ % v/v und bei Methotrexat 13,6 mg/dL wurde keine Interferenz festgestellt.

Die Blutantikoagulanzen EDTA, Natriumcitrat und Heparin wurden zusätzlich mit den empfohlenen Isolierungskits getestet. Es wurde kein Einfluss auf die analytische Leistung festgestellt. Wir gehen davon aus, dass die Arbeitsabläufe der Isolierungskits die getesteten Störsubstanzen, die von Antikoagulanzen und DNA-Isolierungsreagenzien stammen, eliminieren. Das Chemotherapeutikum Methotrexat zeigte bei der getesteten Konzentration im Vergleich zum Referenzblank keine Interferenzen.

Tabelle 14 getestete Konzentrationen von endogenen und exogenen Störfaktoren.

Art des Interferenten	Kategorie	Interferent	Nicht-interferierende Konzentration
Endogen	Vollblutbestandteile	Vollblut	nicht getestet
Exogen	Gerinnungshemmende Mittel	EDTA	0,099 mg/dL
		Natrium, Citrat	8,23 E- 05 % v/v in PCR
		Heparin	2,36 E- 02 mg/dL
	DNA-Isolationsmittel	Proteinase K	3,22 E- 06 % v/v in der PCR-Reaktion
		Ethanol	2.70 E- 03 % v/v in PCR-Reaktion
	Analgetika und Antipyretika	Aspirin (Acetylsalicylsäure)	3 mg/dL
	Antiemetisches Mittel	Metoclopramid	0,225 mg/dL
	Chemotherapeutisches Mittel	Methotrexat	13,6 mg/dL
	Immunsuppressives Mittel	Cyclosporin	0,18 mg/dL

Analytische Sensitivität

Humane gDNA kann im Bereich von 0,125 ng bis 2,00 ng Input genotypisiert werden. In diesem Bereich können vollständige Profile aller DIP-Marker und Amelogenin ohne Fehler gemessen werden. Wir empfehlen 1,00 ng als optimale Inputmenge für eine akzeptable Vollprofilanalyse. Für den Nachweis von gemischtem Chimärismus mit optimaler Sensitivität haben wir verschiedene Inputmengen getestet. Um eine eingeschränkte Sensitivität bei geringen Inputmengen zu vermeiden, haben wir 2,00 ng DNA als optimale Inputmenge für den Nachweis von gemischtem Chimärismus definiert.

Die Linearität wurde auf der Grundlage der Richtlinie CLSI-EP06Ed2 (2. Ausgabe) bewertet. Die Linearität wurde mit sechs verschiedenen gemischten Chimärismus-Proben getestet. Jede gemischte Chimärismusprobe wurde verdünnt, um den Empfängerchimärismus von 1 % bis 90 % abzudecken (1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 %). Die akzeptable Abweichung von der Linearität (ADL) wurde für Proben mit einem Empfängerchimärismus von bis zu 10 % mit 4 % festgelegt, um nur geringe Abweichungen in diesem Bereich zuzulassen. Für Empfängerchimärismus > 10 % wurde die ADL auf 10 % festgelegt, um mittlere Abweichungen von der Linearität zu ermöglichen. Die erwarteten und vorhergesagten Werte lagen bei allen Proben unterhalb der ADL, was die Linearität für den getesteten Chimärismus-Messbereich bestätigt.

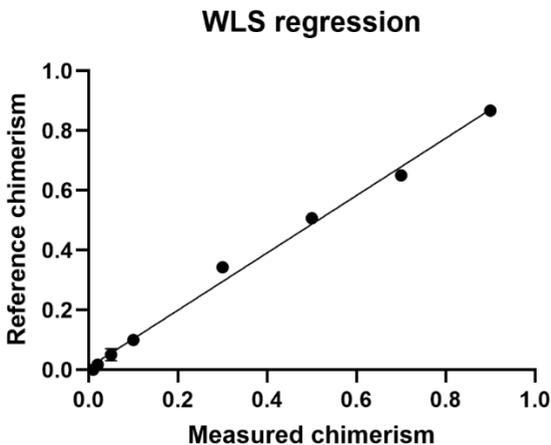


Abbildung 2 Beispiel für die gewichtete Regression verschiedener Chimärismuskonzentrationen für das Chimärismusgemisch 82+1180. Die Regression ergab ein Bestimmtheitsmaß von 0,994, was ein hohes Maß an Linearität zwischen den gemessenen und den erwarteten Werten über den gesamten Testbereich von 1 % bis 90 % Empfängerchimärismus bestätigt.

Der Limit of Blank (LoB) wurde an 31 Einzelgenotyp-DNAs an drei verschiedenen Tagen mit zwei verschiedenen Kit-Chargen getestet. Die LoB für gemischten Chimärismus wurde mit dem nichtparametrischen Ansatz von CLSI - EP17-A2 berechnet ($\alpha = 0,05$, 2. Auflage). Es wurden nur informative Marker analysiert. Das Ergebnis bestätigte einen LOB von 0,49 %.

Unter Verwendung von 2,00 ng DNA haben wir drei verschiedene gemischte Chimärismusproben mit Konzentrationen von 0,50 % bis 3,00 % getestet. Alle Proben wurden mit zwei verschiedenen Kit-Chargen getestet. Unter Verwendung der Probit-Analyse (CLSI - EP17-A2, 2. Auflage) mit einem Konfidenzniveau von 95 % betrug die resultierende Nachweisgrenze (LoD) für Charge 1 1,36 % und 1,39 % für Charge 3. Der daraus resultierende LoD beträgt 1,39 % gemischter Chimärismus.

Tabelle 15 LoD für Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit unter Verwendung informativer Marker

Charge	LoD (% gemischter Chimärismus)	N _{gesamt}
Charge 1	1,36 %	252
Charge 3	1,39 %	252

Das Präzisionsziel für die Bestimmungsgrenze wurde gemäß CLSI - EP17-A2 (2. Auflage) festgelegt. Für den Nachweis von Chimärismus an der LoD definierten wir das Präzisionsziel anhand des Westgard-Modells ($TE = I_{bias} + 1,96 s$; (Westgard et al. 1974 [3])) und der Bias und Präzision des Assays. Die resultierende gepoolte Standardabweichung lag mit 0,45 % unter dem TE-basierten Präzisionsziel von 1,77 %, was eine akzeptable Genauigkeit bei der LoD bestätigt.

Genauigkeit

Die Ungenauigkeit und der Bias kann zwischen verschiedenen Chimärismusgehalten variieren. Der Bereich des gemischten Chimärismus (MC) kann zur Analyse in drei Intervalle unterteilt werden, wie bei Pettersson et al. (2021) [4] beschrieben. Für jedes Intervall wurden angepasste Akzeptanzkriterien festgelegt. Die Intervalle sind:

- Niedriger MC mit < 5 % Anteil des zweiten Genotyps
- Medium MC mit 5 - 20 % Anteil des zweiten Genotyps
- Hoher MC mit > 20 % Anteil des zweiten Genotyps

Die Analyse der Genauigkeit erfolgte auf der Grundlage der CLSI - EP21Ed2E-Leitlinie (2. Ausgabe). Der im Vergleich mit Referenzmaterial

gemessene Bias und die in einer Multisite-Studie gemessene Unpräzision (Reproduzierbarkeit) wurden zur Berechnung eines Sigma-Werts auf der Grundlage der Sigma-Metrik verwendet (Westgard et al. 2018 [3]). Der annehmbare Gesamtfehler wurde auf der Grundlage der Verzerrungsschätzungen der Linearitätsstudie und der berichteten Unpräzision für STR-basierte PCR-Assays für die Chimärismusanalyse ermittelt (Pettersson et al. 2021 [4]). Die resultierenden Werte von sigma zeigten eine gute Genauigkeit für niedrige und mittlere MC-Intervalle und eine ausgezeichnete Genauigkeit für hohe MC-Intervalle.

Tabelle 16 Sigma-Werte für gemischten Chimärismus

Probe	Sigma-Wert
2 % gemischter Chimärismus	3,08
5 % gemischter Chimärismus	3,05
30 % gemischter Chimärismus	4,99

Wahrhaftigkeit

Die Bewertung des Bias basierte auf Referenzmaterial von drei verschiedenen Ringversuchsanbietern (3 verschiedene externe Qualitätskontrollprogramme). Die Verzerrung wurde für die Differenz zwischen dem Ergebnis des Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit und dem Referenzwert berechnet:

$$\Delta MC = \text{Reference MC} - \text{Mentype DIPscreen MC}$$

Die Berechnung der Verzerrung basiert auf der Leitlinie CLSI - EP09Ed3cE (3. Auflage) und verwendete den Durchschnitt der ΔMC -Werte, da eine Normalverteilung nachgewiesen wurde (Shapiro-Wilk-Normalitätstest, $\alpha = 0,05$). Entsprechend den Referenzwerten wurden die Proben in die drei Teilintervalle für MC unterteilt, wie oben beschrieben (Kapitel Genauigkeit). Die resultierende Verzerrung lag zwischen -0,68 und 0,74.

Tabelle 17 Bias (Durchschnitt von ΔMC) für niedrige, mittlere und hohe MC

	niedriger MC (< 5 %)	Medium MC (5 - 20 %)	hoher MC (> 20 %)
Bias (Durchschnitt von ΔMC)	0,54	0,74	-0,68

Neben der Bewertung des Bias haben wir das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit mit einer Referenzmethode verglichen. Die Referenzmethode des PCR-basierten Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit analysiert Short Tandem Repeats (STR), um zwischen zwei Individuen (Genotypen) zu unterscheiden. Beide Methoden wurden mit 97 Patientenproben gemessen, die einen unterschiedlichen Gehalt an gemischtem Chimärismus aufwiesen. Der resultierende Bestimmungskoeffizient von 0,9963 bestätigte eine hohe Korrelation zwischen den beiden Methoden.

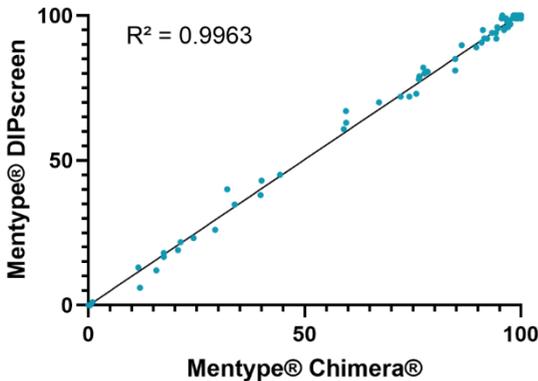


Abbildung 3 Vergleich der Referenzmethoden von Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit und Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit. Die lineare Regression auf der rechten Seite zeigt eine akzeptable Korrelation mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9963.

Präzision

Wir haben die Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit des Assays auf der Grundlage der ISO 5725-2:2022-05 und der CLSI - EP05 (3. Auflage) bewertet. Gemischte Chimärismus-Proben, die den Chimärismus-Messbereich (2 %, 5 %, 30 %, 70 %) abdecken, wurden in einer 5 x 5 x 3 (Tag x Replikat x Standort) Multisite-Studie ausgewertet. Die Wiederholbarkeit für gemischten Chimärismus lag zwischen 0,60 % und 1,68 % Standardabweichung (SD) des gemischten Chimärismus und die Reproduzierbarkeit lag zwischen 0,63 % und 1,75 % SD des gemischten Chimärismus.

Grenzwert für die Analyse (Cut-off)

Wir haben den Assay-Cutoff für das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit auf der Grundlage der Berechnung der Allelhäufigkeit der verschiedenen amplifizierten Marker bewertet. Proben von 81 Personen wurden mit dem Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit analysiert. Die sich daraus ergebenden Allelhäufigkeiten wurden zur Berechnung spezifischer forensischer Diskriminierungsparameter verwendet, die auch für die Chimärismusanalyse relevant sind, wie z. B. der Polymorphismus-Informationsgehalt (Polymorphism information content, PIC), die erwartete Heterozygotie (HET) und die Diskriminierungskraft (Power of Discrimination, PD), die die Fähigkeit eines genetischen Markers oder einer Gruppe von Markern zur Unterscheidung zwischen verschiedenen Individuen innerhalb einer Population anzeigt. Die PIC- und HET-Werte zeigen die hoch polymorphen INDELS und eine hohe Heterozygotierate für das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Die PD für alle DIP-Marker liegt zwischen 0,5146 und 0,6581, was technisch gesehen die Unterscheidung von zwei Individuen auf der Grundlage von mindestens einem Marker ermöglicht, aber die PD steigt, wenn mehr Marker in Kombination verwendet werden.

Tabelle18 Diskriminierungswahrscheinlichkeit aller im Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit enthaltenen Marker. PIC, PD und HET wurden für jeden Marker basierend auf der Analyse von 81 Individuen berechnet.

Marker	PIC	HET	PD
AM	0,3384	0,4341	0,4664
HLD106	0,3066	0,3804	0,5301
HLD70	0,3744	0,5019	0,6572
HLD84	0,3695	0,4921	0,6328
HLD103	0,3703	0,4938	0,6389
HLD104	0,3651	0,4835	0,6389
HLD116	0,3736	0,5003	0,5322
HLD112	0,3725	0,4982	0,5877
HLD307	0,3736	0,5003	0,6054
HLD310	0,3559	0,4660	0,6152
HLD110	0,3685	0,4901	0,6261
HLD133	0,3703	0,4938	0,6462
HLD79	0,3174	0,3981	0,5603
HLD105	0,3736	0,5003	0,6191
HLD140	0,3623	0,4783	0,5972
HLD163	0,3703	0,4938	0,6060
HLD91	0,3712	0,4954	0,5274
HLD23	0,3559	0,4660	0,5850
HLD88	0,3719	0,4969	0,5597
HLD101	0,3740	0,5012	0,6261
HLD67	0,3384	0,4341	0,5834
HLD301	0,3736	0,5003	0,6054
HLD53	0,3593	0,4724	0,6216
HLD97	0,3736	0,5003	0,6411
HLD152	0,3329	0,4246	0,5146
HLD128	0,3750	0,5030	0,6554
HLD134	0,3384	0,4341	0,5752
HLD305	0,3685	0,4901	0,5530
HLD48	0,3695	0,4921	0,6109
HLD114	0,3593	0,4724	0,6353
HLD304	0,3750	0,5031	0,6520

Marker	PIC	HET	PD
HLD131	0,3725	0,4982	0,6581
HLD38	0,3384	0,4341	0,5834
HLD82	0,3103	0,3865	0,5487
MIN	0,3066	0,3804	0,4664
MAX	0,3750	0,5031	0,6581

Stabilität im Gebrauch

Alle Stabilitätsstudien wurden in Übereinstimmung mit ISO 23640:2015 und der CLSI EP25-Richtlinie (2. Auflage) geplant. Das folgende Verfahren wurde für alle Stabilitätsstudien durchgeführt: Das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit wurde zu mehreren Zeitpunkten über verschiedene Zeiträume getestet. Die Analyse der Chimärismusproben wurde mit der ChimerisMonitor IVD durchgeführt, wobei die Einzelgenotyp-DNA von XY1726 und XX1180 den Empfänger bzw. den Spender repräsentierte.

Wir analysierten Einzelgenotyp-DNA XY1726 mit einem DNA-Input von 1 ng und gemischte Chimärismusproben (MC) von XY1726:XX1180 (Empfänger:Spender) mit einem DNA-Input von 1 ng, die die verschiedenen MC-Intervalle von 4 % und 30 % MC repräsentieren. Für die Stabilität der Mastermixe wurden die verschiedenen MC-Intervalle von 30 %, 5 % und 2 % MC mit 1 ng DNA-Input für 30 % und 5 % MC und 2 ng DNA-Input für 2 % MC getestet.

Die abschließende Bewertung der verschiedenen Bedingungen umfasste den Vergleich zwischen den Mittelwerten des Anfangszeitpunkts (t_0) und der verschiedenen Zeitpunkte (t_n) und wurde anhand der folgenden Gleichung berechnet:

$$abs. \Delta_n = |\bar{t}_0 - \bar{t}_n|$$

Für die In-Use-Stabilitätsstudie wurden drei Experimente durchgeführt. Eines zur Prüfung der Stabilität nach Einfrier- und Auftauzyklen, eines zur Prüfung der Stabilität nach unterschiedlicher Handhabung des Mastermixes und ein weiteres zur Prüfung der Stabilität der Kits bei simulierter Verwendung nach dem Öffnen.

Alle im Master-Mix-Stabilitätsexperiment getesteten Proben wiesen ein vollständiges Markerprofil für die Single-Genotyp-DNA XY1726 auf und lagen unter den auf Gesamtfehlern basierenden Genauigkeits- und Präzisionsgrenzen des Assays für die drei getesteten MC-Proben: 30 %,

5 % und 2 % MC mit ihren Grenzen von 3,31 %, 3,62 % bzw. 1,77 %. Somit bleibt das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit unbeeinflusst von einer unterschiedlichen Handhabung des Mastermixes.

Was die Gefrier- und Auftaustabilität betrifft, so zeigt das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit keine kritischen inakzeptablen Abweichungen von T_0 und ein vollständiges Markerprofil für die Single-Genotyp-DNA XY1726 und lag unter den auf dem Gesamtfehler basierenden Genauigkeitsgrenzen des Assays für die getesteten MC-Proben: 30 % und 4 % mit ihren Grenzwerten 3,31 % und 2,85 %. Somit ist das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit für bis zu 20 Gefrier- und Auftauzyklen stabil.

Basierend auf den Ergebnissen für den simulierten Gebrauch nach dem Öffnen ist das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit nach dem ersten Öffnen bis zu 12 Monate stabil, sowie bis zu 20 Gefrier- und Auftauzyklen stabil.

Klinische Leistungsdaten

Studiendesign, ethische und regulatorische Aspekte

Das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit und Referenzmethoden wurden an Patientenproben nach allo-HSCT getestet. Die 10 in diese Studie eingeschlossenen Patienten wurden nach der allo-HSCT überwacht und der Spendergehalt der Proben während der Überwachung wurde 10 Mal nach der allo-HSCT analysiert. Ziel dieser Studie war es, einen klinischen Nachweis gemäß §§ 20 bis 24 des Medizinproduktgesetzes (MPG) in der Fassung vom 7. August 2002 (BGBl. I S 3146) zu erbringen. Mit der zytogenetischen Referenzmethode FISH musste eine Konkordanz mit der auf Deletions-Insertions-Polymorphismus basierenden PCR-Methode des Kits nachgewiesen werden. Die Bestätigung der zuständigen Ethikkommission lag am 14.03.2012 vor.

Referenzmethoden

Als Referenzmethode wurde die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) mit dem allosomspezifischen CE-IVD CEP® X SpectrumOrange™ / Y SpectrumGreen™ Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden) durchgeführt. Um die Referenzmethode anzuwenden, wurden nur Spender-Empfänger-Paare unterschiedlichen Geschlechts in die Studie aufgenommen. Entsprechend den Empfehlungen der Hersteller wurden nur zytogenetische Ergebnisse mit Zellzahlen > 200 ausgewertet.

DNA-Extraktion und -Reinigung

Die DNA wurde mit dem QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE) isoliert. Die Isolierung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll.

Ergebnisse

Die hohe Korrelation zwischen dem Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit und der zytogenetischen Referenzmethode mit $R^2 = 0,9889$ bestätigt die Anwendbarkeit für die Chimärismusüberwachung nach allo-HSCT.

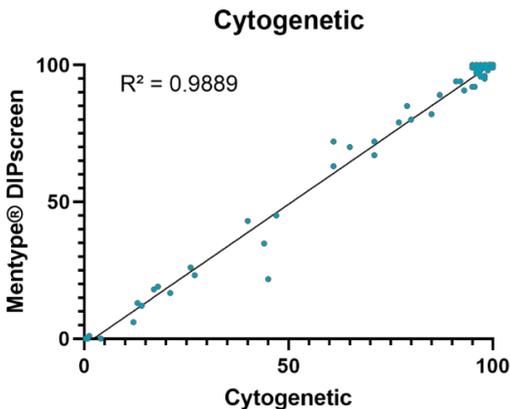


Abbildung 4 Die Korrelation von Ergebnissen der Zytogenetik und Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ist in der Grafik dargestellt. Die lineare Regression ergibt eine akzeptable Korrelation mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9889 (N = 87)

Die daraus resultierende Übereinstimmung von 94,25 % (5 % Δ MC akzeptiert) mit den Ergebnissen der Referenzmethode bestätigt die Zuverlässigkeit des Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit für die Interpretation klinischer Daten.

Diagnostische Auswertung

Die klinischen Leistungsmerkmale zeigten akzeptable Ergebnisse. Die Ergebnisse wurden hinsichtlich einer LoD von PCR und Zytogenetik von 1 % bewertet (Bader et al. 2023 [5]). Die Parameter für die klinische Leistungsbewertung gemäß Anhang I, Abschnitt 9.1b der IVDR erwiesen sich für das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit als nicht vollständig anwendbar. Das Kit überwacht einen Analytenbereich und nicht das Vorhandensein eines Analyten. Daher ist eine Bewertung des negativen und positiven Status des Analyten nicht vollständig anwendbar.

Tabelle 19 Diagnostische Kennzeichen

Diagnostische Kennzeichen	Schätzung	Unteres Konfidenzintervall	Oberes Konfidenzintervall
Diagnostische Sensitivität	96,0 %	90,6 %	100,0 %
Diagnostische Spezifität	76,3 %	62,8 %	89,8 %
Diagnostische Genauigkeit	87,5 %	80,6 %	94,4 %
Positiv prädiktiver Wert	84,2 %	74,7 %	93,7 %
Negativer prädiktiver Wert	93,5 %	84,9 %	100,0 %
Prävalenz	56,8 %	46,5 %	67,2 %

Qualitätskontrolle

Alle Kitkomponenten durchlaufen bei der BIOTYPE GmbH einen intensiven Qualitätssicherungsprozess. Die Qualität des Testkits wird permanent überwacht, um eine uneingeschränkte Verwendbarkeit zu gewährleisten. Bitte kontaktieren Sie uns, wenn Sie Fragen zur Qualitätssicherung haben.

Technische Unterstützung

Für technische Beratung wenden Sie sich bitte an unseren Customer Support:

E-Mail: support@biotype.de

Telefon: +49 (0)351 8838 400

Referenzen

[1] Clark J, Scott S, Jack A, Lee H, Mason J, Carter G, Pearce L, Jackson T, Clouston H, Sproul A, Keen L, Molloy K, Folarin N, Whitby L, Snowden J, Reilly J, Barnett D (2014) Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): Technical recommendations for the use of Short Tandem Repeat (STR) based techniques, on behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leucocyte Immunophenotyping Chimerism Working Group. *British Journal of Haematology* 168, 26–37.

[2] Nollet F, Billiet D, Selleslag D, Criel A (2001) Standardisation of multiplex fluorescent short tandem repeat analysis for chimerism testing. *Bone Marrow Transplantation* 28, 511-518.

[3] Westgard S, Bayat H, Westgard JO (2018) Analytical Sigma metrics: A review of Six Sigma implementation tools for medical laboratories, *Biochemia medica*

[4] Pettersson L, Vezzi F, Vonlanthen S, Alwegren K, Hedrum A, Hauzenberger D (2021) Development and performance of a next generation sequencing (NGS) assay for monitoring of mixed chimerism, *Clinica Chimica Acta*

[5] Bader P, Bornhäuser M, Grigoleit G-U, Kröger N für die DAG-KBT, Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e.V. Monitoring, Chimärismusanalysen und Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD). Allogene Stammzelltransplantation. Onkopedia Leitlinien. www.onkopedia.com. Stand März 2023

Nutzungsbeschränkungen

- Die Verfahren in dieser Gebrauchsanweisung müssen wie beschrieben befolgt werden. Jegliche Abweichung kann zum Versagen des Tests oder zu falschen Ergebnissen führen.
- Die Verwendung dieses Produkts ist auf professionelle Laboranwender beschränkt, die speziell in PCR-Techniken und Kapillargel-Elektrophorese geschult und ausgebildet sind.
- Für die optimale Durchführung dieses Tests sind geeignete Verfahren für die Entnahme, den Transport, die Lagerung und die Verarbeitung der Proben erforderlich.
- Der Kit wurde nur für die Verwendung mit humanen peripheren venösen Vollblutproben validiert, die mit den in Kapitel Geräte und Software aufgeführten PCR-Geräten durchgeführt wurden.
- Dieser Assay darf nicht direkt an der Probe durchgeführt werden. Vor der Verwendung dieses Assays müssen geeignete Nukleinsäureextraktionsverfahren durchgeführt werden.
- Die Kontamination von DNA-Proben mit Blut beeinträchtigt die Leistungsfähigkeit des Produkts. Stellen Sie sicher, dass während der DNA-Extraktion keine Kontamination auftritt, und wiederholen Sie die Extraktion gegebenenfalls.
- Das Kit wurde nur mit den in Kapitel Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterial beschriebenen Kits für die DNA-Extraktion und -Reinigung validiert.
- Um die Leistungsfähigkeit des Kits zu gewährleisten, ist eine gute Laborpraxis erforderlich.
- Die Ergebnisse müssen in Absprache mit Klinikern interpretiert werden, die die Ergebnisse von Chimärismusanalysen mit den Ergebnissen anderer therapie- oder diagnoserelevanter Methoden kombinieren.

- Bei der Interpretation der Ergebnisse muss die Möglichkeit falsch negativer und falsch positiver Ergebnisse berücksichtigt werden.
- Das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit kann nicht verwendet werden, wenn Spender und Empfänger eineiige Zwillinge sind.
- Doppeltransplantationen wurden im Rahmen der Leistungsbewertung nicht validiert.
- Proben, die degradierte DNA enthalten, können die Fähigkeit zum Nachweis der INDEL/DIP- und geschlechtsspezifischen Loci beeinträchtigen.
- Verwenden Sie keine abgelaufenen oder falsch gelagerten Komponenten.
- Die Chimärismusanalyse wurde anhand von patientenspezifischen informativen Markern (für alle Chimärismusbereiche) validiert.
- Proben aus verschiedenen ethnischen Gruppen können unterschiedliche genetische Merkmale aufweisen, wie z. B. unterschiedliche Allelhäufigkeiten, die die Unterscheidungsfähigkeit oder Amplifikation einschränken könnten. Die Allelhäufigkeit einiger DIP-Marker wurde für mehrere Populationen ausgewertet. Die kombinierte Unterscheidungskraft (PD) ist mit Werten von über 0,99 hoch. Dies deutet auf ein relativ geringes Risiko hin, dass der Test eines Patienten auf Amplifikationsprobleme stößt. Allerdings liegen derzeit nur Daten für die kaukasische Bevölkerung vor. Die potenziellen Auswirkungen auf andere ethnische Gruppen können noch nicht abgeschätzt werden.

Informationen zur Bestellung

Richten Sie Ihre Bestellungen per E-Mail an sales@biotype.de.

Produkt	Packungsgröße	Bestellnummer
Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit	25 Reaktionen	45-12300-0025
	100 Reaktionen	45-12300-0100
Matrix Standard BT5 multi	1 x 25 µL	45-15100-0025
	2 x 25 µL	45-15100-0050
ChimerisMonitor IVD	Demolizenz	
	1-Jahres-Lizenz	46-14800-0000
	3-Jahres-Lizenz	

HINWEIS



Einzelnen Komponenten der Kits können nicht separat bestellt werden.

Markenzeichen und Haftungsausschlüsse

Mentype® und Chimera® sind eingetragene Marken der BIOTYPE GmbH.

Andere Marken: ABI PRISM®, GeneMapper®, GeneAmp® und Applied Biosystems® (Gruppe Applied Biosystems LLC); QIAamp® (Qiagen); POP-4™ (Europa: Applied Biosystems LLC, USA: Life Technologies Corporation).

Die PCR ist durch Patente geschützt. Patentinhaber sind Hoffmann-La Roche Inc. und F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Eingetragene Namen, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, sind nicht als gesetzlich ungeschützt zu betrachten.

Das Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ist ein CE-gekennzeichnetes Diagnostik-Kit gemäß der europäischen In-vitro-Diagnostik-Verordnung (EU) 2017/746.

Das Produkt ist nicht von Health Canada lizenziert und nicht von der FDA genehmigt oder zugelassen.

Nicht in allen Ländern verfügbar.

© 2025 BIOTYPE GmbH; alle Rechte vorbehalten.

Erläuterung von Symbolen



Hersteller



Charge



Ausreichend für <N> Prüfungen



Gebrauchsanweisung beachten (eIFU)



Verwendbar bis



Temperaturbegrenzung



Artikelnummer



In-vitro Diagnostikum



Vor Sonnenlicht schützen



Trocken aufbewahren



Einmalige Produktkennung

Weitere in dieser Gebrauchsanweisung verwendete Bezeichnungen:



Nützliche Tipps



Achtung, beachten Sie unbedingt diesen Hinweis!

[blau unterstrichener Text](#)

Links, die zu externen Inhalten wie Homepages oder E-Mail-Adressen führen

schwarz unterstrichener Text

Querverweise im Dokument zur einfachen Navigation

eingerückter, kursiver, fetter Text

Felder, die in einer Software angeklickt werden sollen

Anhang

Elektropherogramme von Referenzproben

Auf den folgenden Seiten finden Sie Beispiele für die Elektropherogramme der Mentype® DIPscreen Allelic Ladder ([Abbildung 5](#)), der Control DNA XY82 (PC, [Abbildung 6](#)) und einer No Template Kontrolle (NTC, [Abbildung 7](#)).

Alle Proben wurden auf einem ProFlex PCR Cycler amplifiziert und auf einem Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer (POP-4™, 36 cm Array) unter Verwendung der validierten Laufparameter analysiert. Die Datenanalyse wurde mit GeneMapper ID-X Version 1.6 durchgeführt. Es wurden Bins, Panelvorlagen und Analysemethoden gemäß [Tabelle 12](#) verwendet.

Die Elektropherogramme sind auf eine Fragmentlänge von 70 – 420 bp (x-Achse) gezoomt. Der allgemeine Bereich für die Fragmentlängenanalyse (x-Achse) mit dem Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit liegt bei 50 bp bis 550 bp. Die Skalierung der y-Achse wurde individuell gemäß der Beschreibung unter jeder Abbildung vorgenommen ([Abbildung 5](#), [Abbildung 6](#), [Abbildung 7](#)).

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder

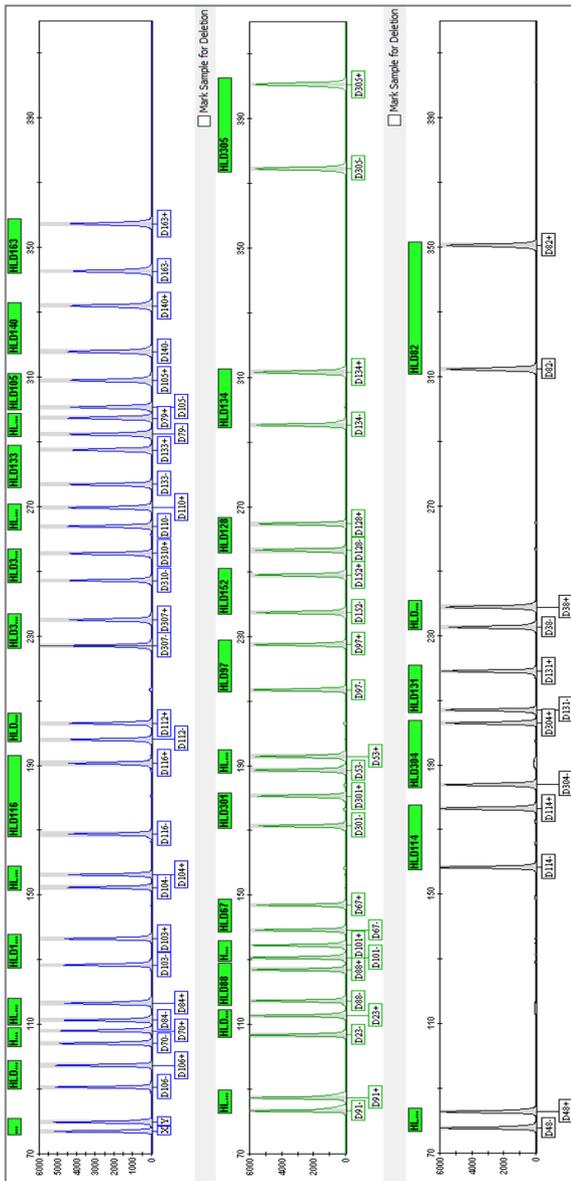


Abbildung 5 Mentype® DIPscreen Allelic Ladder
 Zoom auf 6.000 RFU (y-Achse) und 70 - 420 bp (x-Achse)

Control DNA XY82 (PC)

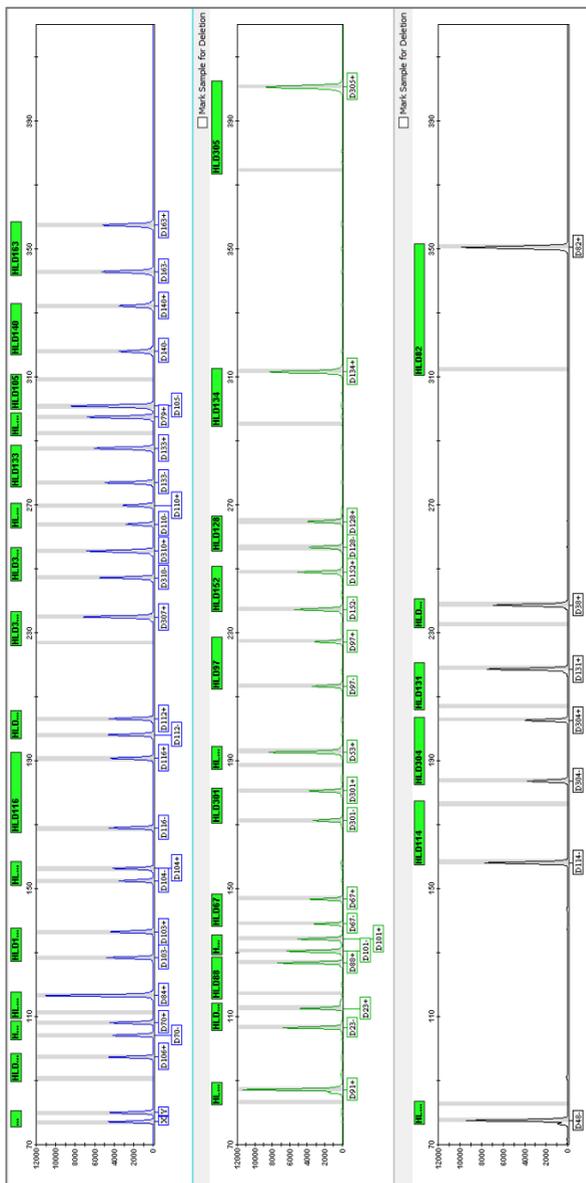


Abbildung 6 Control DNA XY82 (PC)

Zoom auf 12.000 RFU (y-Achse) und 70 - 420 bp (x-Achse)

No Template Kontrolle (NTC)



Abbildung 7 No Template Kontrolle (NTC)

Zoom auf 1.000 RFU (y-Achse) und 70 - 420 bp (x-Achse)

Fragmentlängen und Allele

Tabelle 20 zeigt die Fragmentlängen der einzelnen Allele, die sich auf den DNA Size Standard 550 (BTO) beziehen. Alle Analysen wurden auf einem ABI PRISM® 310/3130 Genetic Analyzer mit POP-4™ Polymer durchgeführt. Unterschiedliche Analysegeräte, DNA-Größenstandards oder Polymere können zu unterschiedlichen Fragmentlängen führen. Darüber hinaus wird ein visueller Abgleich mit der Allelleiter empfohlen.

Tabelle 20 Fragmentlängen der Mentype® DIPscreen Allelic Ladder, analysiert auf einem ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer mit POP-4™ Polymer, * gerundet auf ganze Zahlen

Marker/ Blauer Kanal	Größe -DIP [bp]*	Größe +DIP [bp]*	Marker/ Grüner Kanal	Größe -DIP [bp]*	Größe +DIP [bp]*
Amelogenin	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	157	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/ Gelber Kanal	Größe -DIP [bp]*	Größe +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

Beispiele für die qualitative Bewertung von loci

Tabelle 21 Beispiele für die qualitative Bewertung von informativen Loci

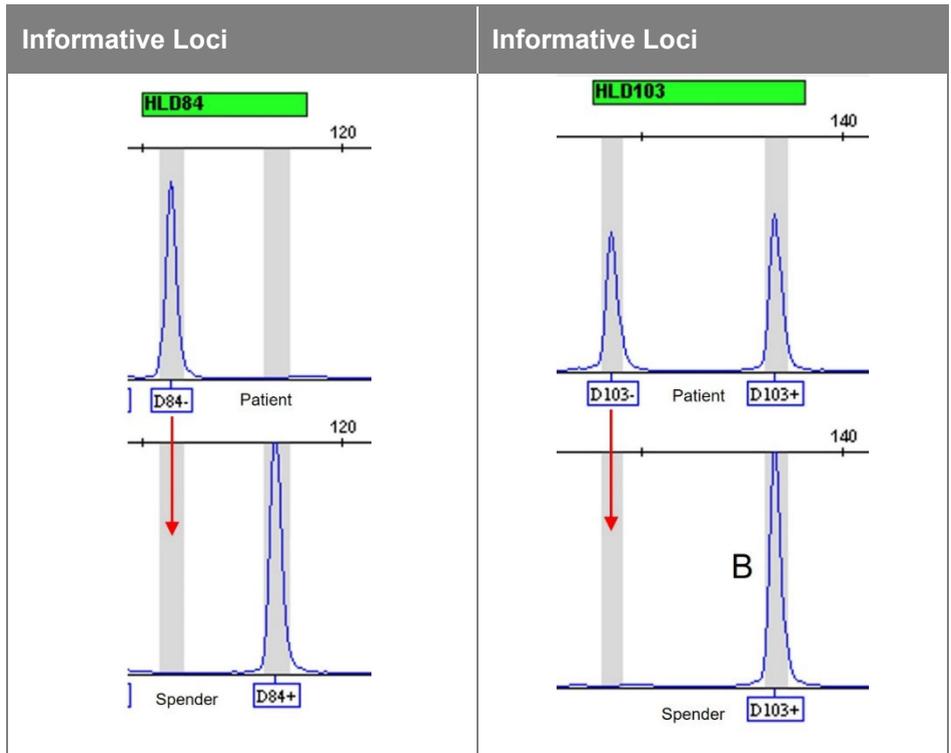
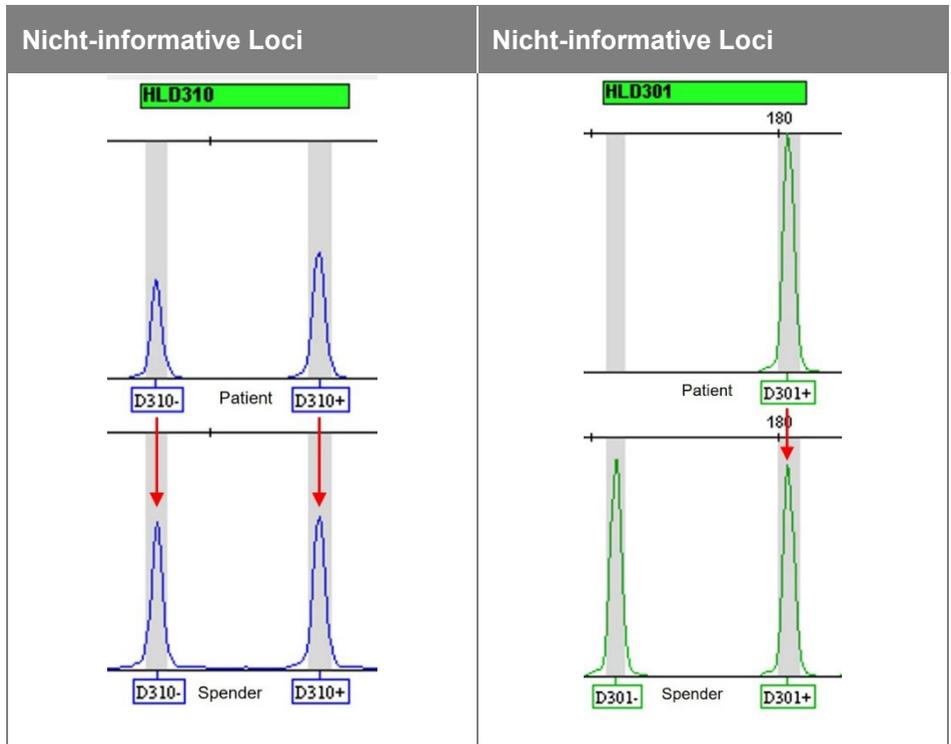


Tabelle 22 Beispiel für die qualitative Bewertung von nicht-informativen Loci



BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Tel.: +49 351 8838 400

Fax: +49 351 8838 403

www.biotype.de

Bestellung

sales@biotype.de

Kundenservice & Support

support@biotype.de

