

# Mentype<sup>®</sup> DIPscreen

PCR Amplification Kit

## Istruzioni per l'uso



0483

Per uso diagnostico in vitro

DISIFU02v2it

05.09.2025



45-12300-0025

45-12300-0100



Codice lotto



BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Sito web: [www.biotype.de](http://www.biotype.de)

E-mail: [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)

Ordini: [sales@biotype.de](mailto:sales@biotype.de)



## Avviso di modifica

Si prega di notare i seguenti adattamenti rispetto alla versione precedente delle istruzioni per l'uso:

Codice documento	Modifiche	Data
DISIFU02v1it	Versione iniziale	24.03.2025
<b>DISIFU02v2it</b>	Oltre alla gestione delle interferenze nel capitolo nelle Limitazioni d'uso	05.09.2025

Una versione stampata di queste istruzioni per l'uso può essere fornita gratuitamente entro 7 giorni.

A tal riguardo o per qualsiasi altra domanda, potete contattarci al numero +49 351 8838 400 o all'indirizzo e-mail

[support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)

# Indice

<b>Destinazione d'uso .....</b>	<b>4</b>
<b>Contesto scientifico .....</b>	<b>4</b>
<b>Descrizione del prodotto.....</b>	<b>5</b>
<b>Materiali forniti .....</b>	<b>7</b>
Contenuto del kit .....	7
Descrizione dei componenti .....	8
<b>Conservazione e manipolazione dei reagenti.....</b>	<b>9</b>
<b>Materiale e dispositivi richiesti ma non in dotazione.....</b>	<b>9</b>
Attrezzature generali di laboratorio .....	9
Reagenti, kit e materiali di consumo .....	10
Strumenti e software .....	11
Esemplari e campioni di prova .....	12
<b>Avvertenze e precauzioni.....</b>	<b>13</b>
<b>Avviso per l'utilizzatore.....</b>	<b>14</b>
<b>Procedura .....</b>	<b>15</b>
Panoramica del flusso di lavoro sperimentale .....	15
Preparazione del campione .....	15
Requisiti del campione grezzo .....	15
Estrazione del DNA .....	16
Quantificazione e diluizione del DNA .....	17
Conservazione del DNA .....	17
Preparazione del controllo .....	18
Controllo positivo PC .....	18
Controllo senza template NTC .....	18
Preparazione della miscela master .....	18
Amplificazione PCR .....	20
<b>Elettroforesi su gel capillare.....</b>	<b>22</b>
Preparazione dei prodotti PCR .....	22

Analisi della lunghezza dei frammenti.....	23
<b>Analisi dei dati.....</b>	<b>25</b>
Procedura generale per l'analisi dei dati.....	25
Convalida dell'esecuzione del flusso di lavoro.....	26
DNA Size Standard 550 (BTO).....	26
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder.....	27
Control DNA XY82 (PC).....	28
Controllo senza templatato NTC.....	29
Analisi del campione.....	30
Analisi dei dati del flusso di lavoro.....	30
Analisi qualitativa - identificazione dei loci informativi.....	31
Analisi semi-quantitativa - analisi del chimerismo.....	31
Analisi dei dati con ChimerisMonitor IVD.....	33
Analisi dei dati con GeneMapper™ ID-X.....	35
Preparazione del software GeneMapper™ ID-X.....	35
<b>Risoluzione dei problemi.....</b>	<b>39</b>
<b>Valutazione delle prestazioni.....</b>	<b>41</b>
Dati sulle prestazioni cliniche.....	50
<b>Controllo qualità.....</b>	<b>53</b>
<b>Assistenza tecnica.....</b>	<b>53</b>
<b>Riferimenti.....</b>	<b>53</b>
<b>Limitazioni d'uso.....</b>	<b>54</b>
<b>Informazioni per l'ordine.....</b>	<b>55</b>
<b>Marchi e dichiarazioni di non responsabilità.....</b>	<b>56</b>
<b>Spiegazione dei simboli.....</b>	<b>57</b>
<b>Appendice.....</b>	<b>59</b>

## Destinazione d'uso

Il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit è un test manuale destinato all'uso con DNA genomico estratto da campioni di sangue intero venoso periferico prelevati da pazienti adulti affetti da leucemia che sono stati sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (allo-HSCT).

Il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit rileva 33 polimorfismi di inserzione e delezione (DIP) e amelogenina in una reazione PCR multiplex. Prima del trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT), questi polimorfismi vengono utilizzati per lo screening qualitativo dei genotipi del paziente e del donatore e per identificare gli alleli DIP specifici del paziente. Questi alleli informativi vengono analizzati per eseguire un monitoraggio semiquantitativo del chimerismo dopo il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche.

Il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit è destinato ai professionisti esperti in tecniche di genetica molecolare, PCR multiplex e nella gestione di Genetic Analyzers di Thermo Fisher Scientific (divisione Applied Biosystems).

## Contesto scientifico

Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (allo-HSCT) è un'opzione terapeutica usata per curare pazienti affetti da malattie ematologiche non maligne e maligne, come la leucemia. L'analisi del chimerismo viene utilizzata per determinare la miscela di cellule ematopoietiche del donatore e del ricevente nei pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche per rilevare i primi segni di rigetto del trapianto. Il sangue venoso periferico umano viene utilizzato per la genotipizzazione e il monitoraggio. Secondo le linee guida CLSI (MM05-A2, seconda edizione), per il prelievo di sangue si raccomandano anticoagulanti come EDTA e citrato. A seconda del successo del trapianto, possono svilupparsi diverse forme di chimerismo ematopoietico (completo, misto o con perdita). Per l'analisi del chimerismo vengono usati diversi approcci, tra cui l'ibridazione in situ con fluorescenza (FISH), il polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP),

l'analisi dell'emocromo e metodi basati sulla PCR. L'analisi dei polimorfismi di inserzione-delezione (INDEL o DIP) consente un'analisi semiquantitativa del chimerismo con approcci PCR multiplex, nonché un'analisi quantitativa con applicazione allele-specifica su piattaforme qPCR o dPCR. Pertanto, tali test DIP sono un prerequisito per un monitoraggio sensibile del chimerismo. Per rilevare segnali precoci di rigetto del trapianto, l'analisi del chimerismo deve essere eseguita a intervalli regolari e poco dopo il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche.

## Descrizione del prodotto

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit è un kit di amplificazione multiplex della reazione a catena della polimerasi (PCR) sviluppato per il monitoraggio del chimerismo. Per la discriminazione donatore-ricevente, i polimorfismi biallelici di inserzione-delezione (INDEL o DIP) con un tasso molto elevato di eterozigosi e una distribuzione allelica bilanciata su 19 cromosomi (vedere [Tabella 1](#)) vengono amplificati simultaneamente in una singola reazione PCR. Un primer per ciascun locus è marcato con fluoroforo 6-FAM™, BTG o BTY. I prodotti della PCR vengono quindi analizzati mediante elettroforesi capillare su gel.

**Tabella 1 Informazioni specifiche sul locus di Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit**, HLD = DIP di locus umano, -DIP = delezione, +DIP = inserzione

Locus DIP	Posizione cromosomica	Locus DIP
<b>Panel FAM</b>		
AM X	Xp22.1-22.3	
AM Y	Yp11.2	
HLD106	16q13	-/AATGCGT
HLD70	6q16.1	-/AGCA
HLD84	8q24.12	-/CTTTC
HLD103	12q23.1	-/GCTTATAA
HLD104	13q32.1	-/ACTC
HLD116	18p11.22	-/AGGTGTCTGAACAACATGATAC
HLD112	17p12	-/TTGTA
HLD307	Xp11.23	-/TCAACCAA
HLD310	2p22.3	-/GTCTGGTT
HLD110	16q22.1	-/TCCCTG
HLD133	3p22.1	-/CAACCTGGATT
HLD79	7q31.2	-/AATCT
HLD105	14q24.3	-/ATAGACAA
HLD140	3q23	-/GGTAGTATGGGCCT

Locus DIP	Posizione cromosomica	Locus DIP
HLD163	12q24.31	-/AACTACTACGGCACGCCC
<b>Panel BTG</b>		
HLD91	11q14.1	-/GATA
HLD23	18p11.32	-/CTTTAA
HLD88	9q22.33	-/CCACAAAGA
HLD101	15q26.1	-/GTAG
HLD67	5q33.3	-/CTACTGAC
HLD301	17q21.32	-/CAGGGGCTC
HLD53	3q22.1	-/ATGT
HLD97	13q13.1	-/AGAGAAAGCTGAAG
HLD152	16p13.2	-/TGGTCAAAGGCA
HLD128	1q31.3	-/ATTAAATA
HLD134	5q11.2	-/ATGATGGTTTCAGA
HLD305	20q11.22	- /CAAGGTCCCACCACACTCGCGTGGGA
<b>Panel BTY</b>		
HLD48	2q11.2	-/GACTT
HLD114	17p13.2	-/TCCTATTCTACTCTGAAT
HLD304	9q34.3	-/GAGCTGCTCAAGAGAGAGG
HLD131	7q36.2	-/TTGGGCTTATT
HLD38	1q32.2	-/TAGTT
HLD82	7q21.3	-/ACCTCCTACTCCTTGGTCTATTCTG GTCACATGTA

Il test è stato convalidato mediante analisi del chimerismo su oltre 200 coppie donatore-ricevente compatibili con HLA e la sua idoneità è stata confermata in uno studio di valutazione clinica comparativa.

Il limite di rilevamento per l'analisi qualitativa è di 125 pg di DNA genomico.

L'intervallo di ingresso per il rilevamento del chimerismo misto in condizioni standard è di 1,0 – 2,0 ng gDNA. L'input ottimale di gDNA è di 2 ng in condizioni standard.

È possibile ottenere una sensibilità dell'1,4 % LoD<sub>95</sub> (limite di rilevamento) utilizzando 2 ng di gDNA come input per l'analisi di marcatori informativi. Per raggiungere la suddetta sensibilità, si raccomanda di utilizzare il maggior numero possibile di marcatori informativi.

## Materiali forniti

### Contenuto del kit

**Tabella 2 Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit**

Reagente	Colore del cappuccio	Volume per dimensione della confezione	
		25 reazioni	100 reazioni
Nuclease-Free Water	Azzurro	1,5 mL	2 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Viola	125 µL	500 µL
Mentype® DIPscreen Primer Mix	Rosso	125 µL	500 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Bianco	15 µL	60 µL
Control DNA XY82 (2 ng/µL)	Bianco	10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Arancione	13 µL	50 µL
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder	Verde	25 µL	25 µL

Una panoramica dei numeri di lotto dei componenti è riportata sull'etichetta situata all'interno della linguetta della confezione.

#### NOTA

Si prega di tener presente che la dimensione dell'imballaggio descrive il numero di test **senza** tener conto del numero di controlli richiesti o dell'eccesso richiesto per il pipettaggio.

**i**

Si consiglia di utilizzare le seguenti dimensioni per la produzione corrispondente:

- < 8 campioni per ogni ciclo di PCR: dimensioni della confezione per 25 reazioni
- ≥ 8 campioni per ogni ciclo di PCR: dimensioni della confezione per 100 reazioni

## Descrizione dei componenti

**Nuclease-Free Water:** acqua di grado PCR, utilizzata nella configurazione PCR e come controllo senza template (NTC).

**Reaction Mix A:** tampone PCR contenente dNTP e MgCl<sub>2</sub>. Il tampone PCR è ottimizzato per promuovere l'attività enzimatica per la PCR.

**Mentype® DIPscreen Primer Mix:** mix di primer oligonucleotidici multiplex contenente primer marcati (marker: 6-FAM™, BTG, BTY) e primer non marcati.

**Multi Taq 2 DNA Polymerase:** dNA polimerasi hot start Taq, 2,5 U/μL.

**Control DNA XY82 (2 ng/μL):** DNA genomico isolato da sangue EDTA di un maschio umano di origine singola. Il DNA deve essere utilizzato come controllo positivo esterno qualitativo per il Mentype® DIPscreen Amplification Kit.

### NOTA



Il Control DNA XY82 non è critico per il professionista di laboratorio, poiché è costituito da singole molecole di DNA che sono state purificate, non sono pericolose e non hanno funzioni biologiche attive. Non contiene cellule viventi od organismi patogeni che possano costituire una minaccia diretta.

**DNA Size Standard 550 (BTO):** miscela di frammenti PCR marcati con fluoroforo con lunghezze definite dei frammenti tra 60 e 550 bp, il componente viene aggiunto a ciascun prodotto PCR prima dell'analisi della lunghezza del frammento, viene usato per una regressione dimensionale al fine di determinare esattamente la lunghezza del frammento dei prodotti della PCR.

**Mentype® DIPscreen Allelic Ladder:** miscela di prodotti della PCR artificiali che rappresentano tutti gli alleli rilevati dal test, utilizzati come riferimento di genotipizzazione per l'identificazione esatta dell'allele.

## Conservazione e manipolazione dei reagenti

Il kit viene spedito in ghiaccio secco. I componenti del kit devono arrivare congelati, tranne Multi Taq 2 DNA Polymerase, che è conservato in un tampone che impedisce il congelamento del reagente.

Al momento del ricevimento, assicurarsi che il kit sia completo. Non utilizzare kit che all'arrivo risultano scongelati. Se uno o più componenti non sono congelati, o se le provette o la confezione sono state danneggiate durante la spedizione, non è possibile garantire le prestazioni.

Conservare tutti i componenti a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C, al riparo dalla luce. In particolare, Mentype® DIPscreen Primer Mix, DNA Size Standard 550 (BTO) e Mentype® DIPscreen Allelic Ladder devono essere conservati al riparo dalla luce.

Per evitare contaminazioni, si raccomanda di conservare e utilizzare i componenti di pre-amplificazione (campioni di DNA, Control DNA XY82) e i componenti di post-amplificazione (DNA Size Standard 550 (BTO) e Mentype® DIPscreen Allelic Ladder) separatamente dai reagenti della PCR (Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A e Mentype® DIPscreen Primer Mix).

Il kit scade in base alle informazioni riportate sull'etichetta della confezione o 12 mesi dopo l'apertura, a seconda di quale evento si verifichi per primo. Non superare un massimo di 20 cicli di congelamento/scongelo.

## Materiali e dispositivi richiesti ma non in dotazione

### Attrezzature generali di laboratorio

- Centrifuga da tavolo con rotore per provette da reazione da 2 mL e 200 µL
- Centrifuga con rotore per piastre da microtitolazione per piastre da reazione a 96 pozzetti
- Miscelatore vortex

- Pipette calibrate regolabili con puntali monouso a filtro ermetici agli aerosol
- Piastre da reazione appropriate da 200 µL a 96 pozzetti o provette da reazione da 200 µL con materiale di chiusura corrispondente, grado PCR
- Rack adatti per provette di reazione da 2 mL e 200 µL
- Rack di raffreddamento adatto a provette da 2 mL
- Guanti monouso senza polvere
- NanoDrop™ One Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) o Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific)

#### NOTA



Tutti i materiali utilizzati per la PCR devono essere di qualità adeguata (privi di DNA e per biologia molecolare). Assicurarsi che tutti gli strumenti utilizzati siano stati installati, calibrati, controllati e sottoposti a manutenzione secondo le istruzioni e le raccomandazioni del produttore.

## Reagenti, kit e materiali di consumo

**Tabella 3 Reagenti necessari, ma non in dotazione**

Reagente	Fornitore	Numero d'ordine
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™ Formamide, 25 mL	Thermo Fisher Scientific	4311320
POP-4™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 samples)	Thermo Fisher Scientific	4393715

Reagente	Fornitore	Numero d'ordine
POP-7™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 samples)	Thermo Fisher Scientific	4393708
Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series	Thermo Fisher Scientific	4393927
Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series	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

## Strumenti e software

Il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit è stato convalidato per l'uso con i seguenti termociclatori PCR:

- ProFlex PCR System (n. cat.: 4484073 (blocco di campioni da 3 x 32 pozzetti), 4484075 (blocco di campioni da 96 pozzetti), Thermo Fisher Scientific)
- GeneAmp® PCR System 9700 Silver (fuori produzione, n. cat. N805-0200, Thermo Fisher Scientific)
- Mastercycler nexus gradient (n. cat.: 6331000017, Eppendorf AG)
- Biometra Tadvanced (n. cat.: 846-2-070-214, Analytik Jena)

Per eseguire il test è necessario solo uno degli strumenti sopra elencati.

L'applicazione di strumenti diversi da quelli sopra indicati deve essere approvata dall'utilizzatore. Devono essere soddisfatte le seguenti specifiche:

- coperchio riscaldato
- blocco adatto a piastre / provette di reazione da 200 µL
- ramping regolabile a 4 - 5 °C/s

Il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit è stato convalidato per l'uso con gli strumenti e le impostazioni seguenti:

- Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), versione del software 4.0.1
  - POP-4™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzer
  - POP-7™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzer

- 3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 36 cm
- 3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 50 cm

Il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit è stato convalidato per l'uso con i seguenti software. Per analizzare e valutare i dati è necessario solo uno dei software elencati di seguito. Una valutazione manuale dei file fsa o dei risultati forniti dal software per la raccolta dei dati senza una delle due opzioni software descritte per l'analisi e la valutazione dei dati non è convalidata.

- ChimerisMonitor IVD, versione 3.0.x (BIOTYPE GmbH)
- Software GeneMapper™ ID-X, versione 1.6 (Thermo Fisher Scientific), utilizzando il prodotto specifico:
  - AnalysisMethod: DIPscreenIVD\_Analysis4\_v1x o DIPscreenIVD\_Analysis7\_v1x
  - Bin: DIPscreenIVD\_Bins4\_v1x o DIPscreenIVD\_Bins7\_v1x
  - Panel: DIPscreenIVD\_Panel4\_v1x o DIPscreenIVD\_Panel7\_v1x
  - Size Standard: BTO\_60-550\_v1x

### NOTA



Assicurarsi che tutti gli strumenti utilizzati siano stati installati, calibrati, controllati e sottoposti a manutenzione secondo le istruzioni e le raccomandazioni del produttore.

## Esemplari e campioni di prova

I seguenti esemplari sono stati convalidati con il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit:

- DNA genomico isolato da sangue intero venoso periferico umano (EDTA, citrato, eparina) per il monitoraggio e la genotipizzazione.

Il gDNA isolato deve essere conservato non diluito a una temperatura compresa fra -25 °C e -15 °C.

## NOTA



Assicurarsi che l'anticoagulante utilizzato per il prelievo di sangue sia compatibile con le istruzioni del produttore del kit di isolamento del DNA.

## Avvertenze e precauzioni

- Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di utilizzare il prodotto.
- Leggere le schede di sicurezza (SDS) e le dichiarazioni di non pericolosità (NHS) per tutti i prodotti BIOTYPE, disponibili su richiesta o tramite la nostra homepage ([www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter](http://www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter)). Per i prodotti che non richiedono una SDS in quanto non contengono SVHC o sono soggetti ad altre restrizioni del regolamento 1272/2008 (CLP), BIOTYPE fornisce la SDS su richiesta.
- Si prega di contattare i produttori dei materiali e dei reagenti richiesti, ma non forniti, per ottenere le copie delle SDS di eventuali reagenti aggiuntivi necessari.
- I componenti del kit di lotti diversmarini non devono essere mescolati.
- Non è consentita l'aliquotazione dei componenti del kit in altri recipienti di reazione.
- L'uso di questo prodotto è limitato ai professionisti di laboratorio, specializzati nell'uso di tecniche di genetica molecolare, nella PCR multiplex e nella gestione dei Genetic Analyzers di Thermo Fisher Scientific.
- Prima del primo utilizzo, verificare che il prodotto e i suoi componenti non presentino problemi:
  - Integrità
  - Completezza per quanto riguarda il numero, il tipo e il riempimento (vedere il capitolo Materiali forniti)
  - Etichettatura corretta
  - Congelamento all'arrivo (tranne Multi Taq 2 DNA Polymerase)
- I campioni devono sempre essere trattati come infettivi e/o a rischio biologico in conformità alle procedure di laboratorio sicure e alle buone pratiche di laboratorio.

- Non utilizzare un kit che ha superato la data di scadenza.
- Smaltire i campioni e i rifiuti del saggio secondo le norme di sicurezza locali.
- Tutti gli strumenti utilizzati sono stati installati, calibrati, controllati e sottoposti a manutenzione secondo le istruzioni e le raccomandazioni del produttore.

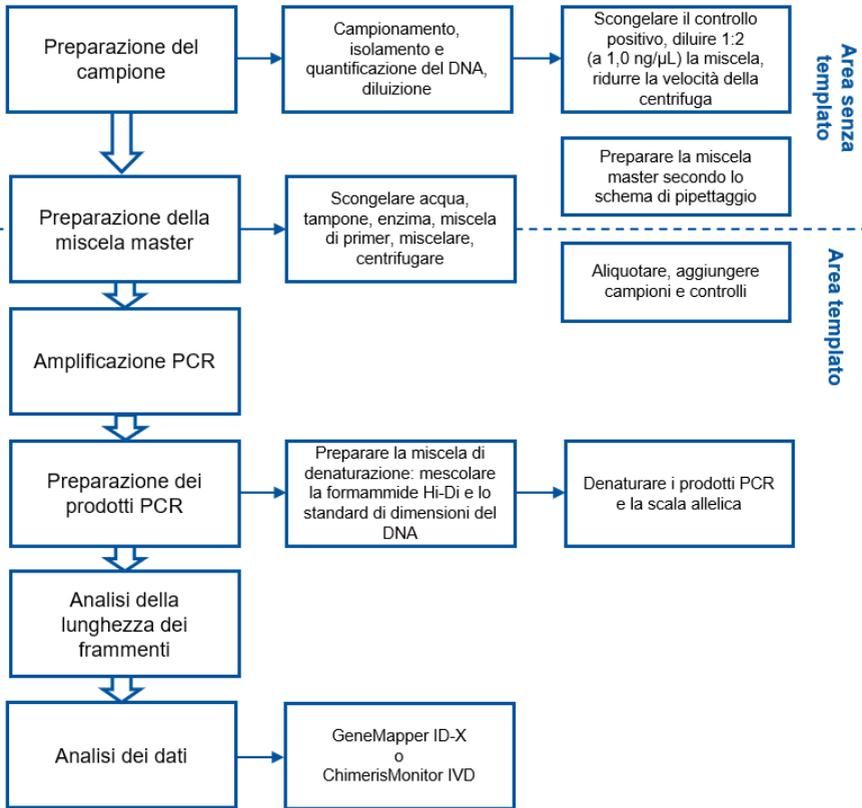
## **Avviso per l'utilizzatore**

L'utilizzatore è tenuto a segnalare al produttore qualsiasi problema che si verifichi in relazione al prodotto. Qualsiasi incidente grave relativo a questo kit deve essere segnalato al produttore e all'autorità competente degli Stati membri in cui l'utilizzatore e/o il paziente è stabilito.

Una sintesi della sicurezza e delle prestazioni (SSP) è redatta in conformità all'articolo 29 del regolamento (UE) 2017/746 e ha lo scopo di fornire accesso pubblico tramite il database EUDAMED a una sintesi aggiornata dei dati sulla sicurezza e sulle prestazioni del dispositivo agli utilizzatori previsti; nel caso di questo prodotto solo ai professionisti di laboratorio.

## Procedura

### Panoramica del flusso di lavoro sperimentale



### Preparazione del campione

#### Requisiti del campione grezzo

Prelevare almeno un campione di 200 μL di sangue venoso periferico intero per la seguente procedura.

La gestione del campione grezzo (sangue venoso periferico intero) deve seguire le raccomandazioni della linea guida MM05–A2 (2ª edizione) del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), secondo cui il sangue intero può essere conservato a temperatura ambiente (da 22 °C a 25 °C) per un massimo di 24 ore, o a una temperatura compresa tra 2 °C e 6 °C per 72 ore o più. Inoltre, si raccomanda che gli anticoagulanti utilizzati per la raccolta del sangue intero siano EDTA, citrato o eparina.

#### NOTA



La lunga conservazione del materiale del campione grezzo potrebbe portare a una frammentazione del materiale genetico e, di conseguenza, a una qualità insufficiente del materiale. Ciò può peggiorare il risultato dell'analisi, ad esempio a causa di profili incompleti.

#### Estrazione del DNA

Eseguire l'estrazione e la purificazione del DNA da campioni di sangue intero venoso periferico secondo le istruzioni del produttore. I seguenti kit sono stati verificati nell'ambito della valutazione delle prestazioni del prodotto:

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit
- Macherey-Nagel NucleoSpin® Dx Blood, mini kit certificato CE per DNA da sangue

#### NOTA



La contaminazione da sangue può essere rilevata visivamente nella reazione di PCR o nel DNA isolato da un cambiamento di colore arancione. Se si osserva un cambiamento di colore, si consiglia di ripetere l'isolamento del DNA per evitare potenziali interferenze.

#### NOTA



Assicurarsi di eliminare qualsiasi traccia di etanolo prima dell'eluizione dell'acido nucleico. L'etanolo è un forte inibitore della PCR.

### Quantificazione e diluizione del DNA

Quantificare la concentrazione di DNA mediante spettroscopia UV/VIS a 260 nm, utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop o mediante spettroscopia di fluorescenza usando il Qubit™ Fluorometer.

Quando si utilizza la spettrofotometria, utilizzare il tampone di eluizione del kit di estrazione del DNA per misurare il bianco. Il rapporto  $A_{260}/A_{280}$  deve essere compreso tra 1,7 e 1,9, mentre il rapporto  $A_{260}/A_{230}$  dovrebbe essere compreso nell'intervallo tra 1,8 e 2,3.

Per la quantificazione fluorimetrica del DNA, è possibile utilizzare il Qubit™ Fluorometer con il Qubit 1x dsDNA HS Assay-Kit o il Qubit dsDNA BR Kit.

Per l'uso con il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, diluire i campioni di DNA a una concentrazione ottimale di 2,0 ng/μL. Preparare la diluizione appena prima dell'uso. Utilizzare acqua priva di nucleasi come diluente.

#### NOTA



L'intervallo di input totale per il kit è 0,125 – 2,0 ng di DNA a reazione, **l'input ottimale è 2 ng di DNA** a reazione in condizioni standard per la massima sensibilità. Un input inferiore a 0,125 ng potrebbe portare a profili incompleti, un input più alto potrebbe portare a picchi di pull-up.

### Conservazione del DNA

Il DNA deve essere conservato non diluito a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per la conservazione a lungo termine o secondo le informazioni del produttore del kit di isolamento del DNA.

## Preparazione del controllo

### Controllo positivo PC

Scongelare il Control DNA XY82, omogeneizzarlo mediante vortex e centrifugare brevemente.

Diluire il Control DNA XY82 a 1:2 da 2,0 ng/μL a 1,0 ng/μL utilizzando Nuclease-Free Water.

Omogeneizzare il PC diluito con una breve agitazione al vortex. Successivamente, centrifugare brevemente il PC diluito (per circa 10 secondi). Non conservare il controllo positivo diluito.

#### NOTA



Applicare sempre una nuova diluizione del Control DNA XY82.

### Controllo senza template NTC

Applicare la Nuclease-Free Water inclusa nel kit come controllo senza modello (NTC) al posto del campione.

## Preparazione della miscela master

Rimuovere i seguenti componenti dal Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit per preparare la miscela master:

- Nuclease-Free Water (tappo azzurro)
- Reaction Mix A (tappo viola)
- Mentype® DIPscreen Primer Mix (tappo rosso)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (tappo bianco)

Tutti i componenti congelati devono essere scongelati a temperatura ambiente (da 22 °C a 28 °C, circa 30 minuti, al riparo dalla luce) e omogeneizzati capovolgendo le provette o agitando delicatamente il vortex. Successivamente, centrifugare brevemente i reagenti (per circa 10 secondi).

Per rispettare i principi delle buone pratiche di laboratorio, si consiglia di conservare il Multi Taq 2 DNA Polymerase in un ambiente refrigerato il più a lungo possibile (ad es., in un rack refrigerato) prima di preparare la miscela master.

**NOTA**

Miscelare la Multi Taq 2 DNA Polymerase agitando per una maggiore stabilità. **Non agitare l'enzima.**

Preparare la miscela master PCR conformemente a quanto descritto nella Tabella 4 in una provetta da microcentrifuga di dimensioni adeguate al numero totale di campioni da analizzare in un'area pulita dedicata. Includere nel calcolo almeno un PC e un NTC.

**NOTA**

Come regola generale, se si analizzano meno di 10 campioni, utilizzare una quantità di miscela master sufficiente per un campione in più. Se si analizzano 10 o più campioni, utilizzare un volume di miscela master di reagente in eccesso pari a + 10%.

**Tabella 4 Preparazione della reazione della miscela master PCR, \*** Il volume dipende dalla concentrazione di DNA. Se si utilizza un volume maggiore di modello di DNA, assicurarsi di regolare il volume di Nuclease-Free Water. Il volume totale di reazione (rxn) deve essere sempre di 25,0 µL.

Componente	Volume		
	1 rxn	5 rxn	10 rxn
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
Modello di DNA o campione di controllo	1,0 µL*	5 x 1,0 µL*	10 x 1,0 µL*
<b>Volume totale</b>	<b>25,0 µL</b>	<b>125,0 µL</b>	<b>250,0 µL</b>

Miscelare la miscela master agitando delicatamente al vortex, quindi centrifugare brevemente la miscela.

Aliquotare 24,0 µL di miscela master PCR in provette PCR da 200 µL e centrifugare brevemente le provette chiuse.

### **Applicazione di modelli di DNA e controlli**

Aggiungere 1,0 µL dei seguenti tipi di campioni alle provette PCR preparate contenenti la miscela master PCR.

**NTC:** aggiungere 1,0 µL di Nuclease-Free Water al posto di un campione.

**Campione:** aggiungere 1,0 µL di campioni di gDNA preparati e diluiti (2,0 ng/µL).

**PC:** aggiungere 1,0 µL del Control DNA XY82 preparato e diluito 1:2 (1,0 ng/µL) al posto di un campione.

#### **NOTA**



Innanzitutto, preparare l'NTC per evitare contaminazioni del controllo. Preparare il PC da ultimo per evitare contaminazioni incrociate dei campioni.

#### **NOTA**



Utilizzare almeno un controllo positivo (PC) e un controllo senza template (NTC) per ogni ciclo. In caso contrario, non è possibile convalidare il ciclo.

Chiudere tutte le provette PCR, agitare delicatamente con il vortex e diminuire la velocità di centrifugazione.

## **Amplificazione PCR**

Programmare il termociclatore PCR con il seguente profilo di amplificazione, assicurarsi di impostare il ramping a 4 - 5 °C/s. Eseguire una PCR “hot start” per attivare la polimerasi e prevenire la formazione di prodotti di amplificazione non specifici.

**Tabella 5 Protocollo PCR**

Temperatura	Tempo	
94 °C	4 min	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	28 cicli
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	hold

**NOTA**

Se si utilizzano termociclatori con fasi di riscaldamento e raffreddamento regolabili, **il ramping deve essere regolato a 4 - 5 °C/s** per fornire un bilanciamento ottimale del segnale.

**NOTA**

Per informazioni di base relative alla configurazione, alla programmazione e alla manutenzione dei diversi strumenti PCR, consultare il manuale d'uso del rispettivo strumento.

**NOTA**

Anche piccolissime quantità di DNA possono causare perdite statistiche e squilibri dei picchi. L'aumento del numero di cicli di PCR aumenta il rischio di contaminazione incrociata causata da quantità minime di impurità. Inoltre, potrebbero comparire prodotti di amplificazione non specifici.

## Elettroforesi su gel capillare

### Preparazione dei prodotti PCR

Dopo aver completato la PCR, rimuovere i campioni dal termociclatore e centrifugare brevemente.

#### NOTA



Dopo aver completato la PCR, i prodotti della PCR possono essere conservati fino a 4 settimane a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C oppure a lungo termine a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C al riparo dalla luce.

Scongelare, mescolare e centrifugare i reagenti:

- Hi-Di™ Formamide (non inclusa nel kit)
- Mentype® DIPscreen Allelic Ladder (tappo verde)
- DNA Size Standard BTO (550) (tappo arancione)

Preparare la miscela di denaturazione descritta nella [Tabella 6](#) e aggiungere una o due reazioni per compensare le variazioni di pipettaggio. Includere una reazione supplementare per la scala allelica.

#### Tabella 6 Miscela di denaturazione

Componente	Volume per reazione
Hi-Di™ Formamide	12,0 µL
DNA Size Standard BTO (550)	0,5 µL

Pipettare 12,0 µL di miscela di denaturazione nei pozzetti di una piastra PCR (adatta all'uso nel Genetic Analyzer).

Aggiungere 1,0 µL di prodotto della PCR o 1,0 µL di Mentype® DIPscreen Allelic Ladder nei pozzetti. Sigillare la piastra PCR con una pellicola adatta, agitare e centrifugare brevemente la piastra.

**NOTA**



La scala allelica viene utilizzata per determinare correttamente i frammenti analizzati durante l'analisi dei dati. In ogni analisi della lunghezza dei frammenti, occorre analizzare la scala allelica almeno una volta per garantire una valutazione corretta dei dati.

**NOTA**



I capillari del dispositivo per elettroforesi su gel non devono mai asciugarsi. Se i campioni non occupano tutte le posizioni dei capillari, riempire i pozzetti aggiuntivi della piastra con 12,0 µL di Hi-Di™ Formamide in base al numero di capillari.

Denaturare i prodotti della PCR preparati su un termociclatore PCR per 3 minuti a 95 °C , quindi far raffreddare i campioni a 4 °C nel termociclatore. Centrifugare brevemente i campioni prima di eseguire l'analisi della lunghezza dei frammenti.

## **Analisi della lunghezza dei frammenti**

Prima di eseguire la prima analisi della lunghezza dei frammenti, eseguire il Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE GmbH) per un allineamento spettrale dei coloranti fluorescenti utilizzati per il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit (6-FAM™, BTG, BTY, BTO).

**NOTA**



Per l'installazione, consultare le istruzioni per l'uso di Matrix Standard BT5 multi, che sono disponibili all'indirizzo [www.biotype.de/en/ifus](http://www.biotype.de/en/ifus) o su richiesta scrivendo a [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de) di BIOTYPE GmbH.

Dopo aver eseguito correttamente il Matrix Standard BT5 multi, importare le impostazioni dello strumento fornite per il 3500 Series Genetic Analyzer come descritto nella Tabella 7 ([www.biotype.de/en/template-files](http://www.biotype.de/en/template-files)).

**Tabella 7 File forniti per Genetic Analyzers**[www.biotype.de/en/template-files](http://www.biotype.de/en/template-files)

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

Le specifiche per il protocollo dello strumento richiesto sono descritte nella [Tabella 8](#). Dovrebbero essere regolati solo i parametri descritti, gli altri parametri dovrebbero rimanere nell'impostazione predefinita. Seguire le istruzioni d'uso del produttore per impostare i parametri di funzionamento specifici.

**Tabella 8 Parametri per i moduli di esecuzione dei diversi dispositivi di elettroforesi su gel capillare**

	Injection Voltage [kV]	Injection Time [s]	Run Voltage [kV]	Run Time [s]
3500 Series Genetic Analyzer	3,0	8	36 cm capillary array: 15	1560
			50 cm capillary array: 19.5	

A differenza dei valori riportati nella [Tabella 8](#), il tempo di esecuzione può essere regolato in base alla lunghezza del capillare utilizzato, ma è obbligatorio analizzare tutti i frammenti (60 – 550 bp) del DNA Size Standard 550 (BTO).

Per impostare un Size Standard protocol è necessario assegnare al pannello arancione le seguenti dimensioni per il DNA Size Standard 550 (BTO):

**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 e 550 bp.**

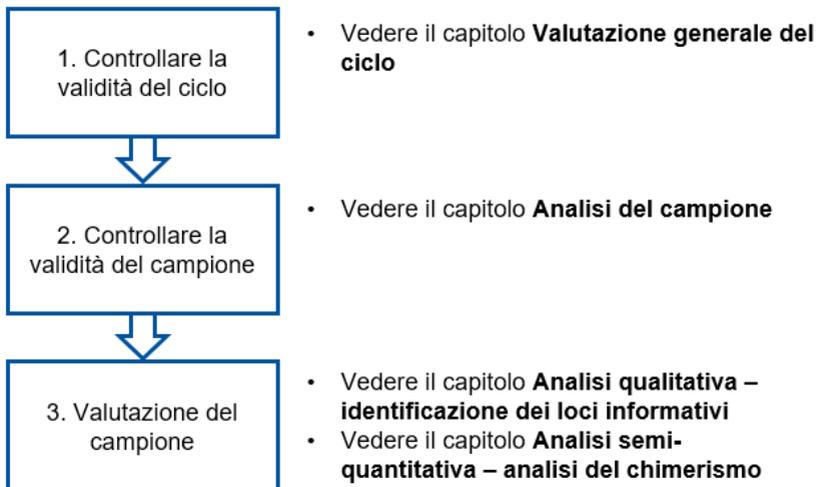
#### NOTA



BIOTYPE GmbH fornisce modelli specifici per la facile installazione di impostazioni di esecuzione determinate per l'analisi della lunghezza dei frammenti, nonché modelli di analisi per una semplice configurazione del software di GeneMapper™ ID-X. Questi modelli sono disponibili per il download all'indirizzo: [www.biotype.de/en/template-files](http://www.biotype.de/en/template-files).

## Analisi dei dati

### Procedura generale per l'analisi dei dati

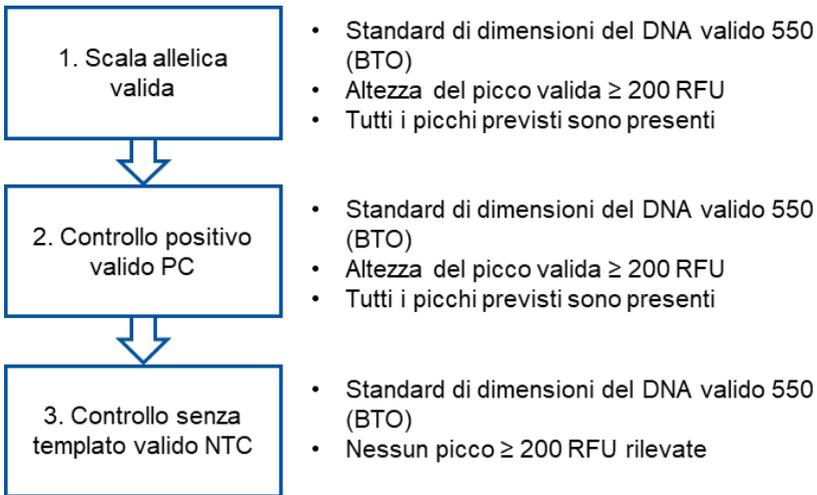


**NOTA**



L'analisi dei dati deve essere eseguita con il software ChimerisMonitor IVD o con il software GeneMapper™ ID-X (Thermo Fisher Scientific). Una valutazione manuale dei file fsa o dei risultati forniti dal software per la raccolta dei dati senza una delle due opzioni software descritte per l'analisi e la valutazione dei dati non è convalidata.

**Convalida dell'esecuzione del flusso di lavoro**



**NOTA**



L'intervallo di misurazione 50 - 560 bp deve essere analizzato per valutare la validità.

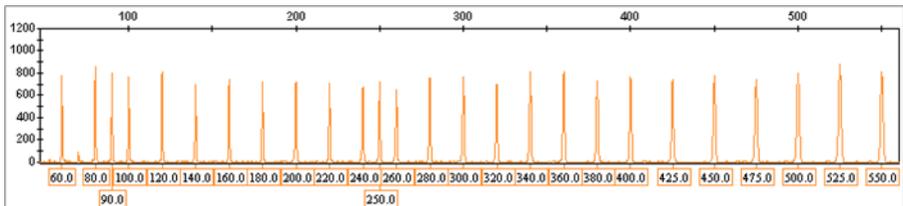
**DNA Size Standard 550 (BTO)**

Trovare le lunghezze esatte dei prodotti amplificati dipende dal tipo di dispositivo, dalle condizioni di elettroforesi e dallo standard di dimensioni del

DNA utilizzato. A causa della complessità di alcuni loci, la determinazione delle dimensioni deve basarsi su riferimenti uniformemente distribuiti.

Controllare il DNA Size Standard 550 (BTO) in tutti i campioni in base ai seguenti criteri:

- Presenza di tutti i frammenti a: **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 e 550** bp
- Tutti i frammenti sono presenti con altezze di picco superiori al cut-off **≥ 50 RFU**
- Coefficiente di determinazione  **$R^2 > 0,995$** .
- L'altezza dei picchi dei frammenti non diminuisce in modo continuo con l'aumentare della lunghezza dei frammenti.



**Figura 1 Elettroferogramma del DNA Size Standard 550 (BTO), frammenti con lunghezze in bp**

### Mentype® DIPscreen Allelic Ladder

Dopo aver verificato un adeguato standard dimensionale, controllare che tutti i picchi presenti nella scala allelica siano presenti con altezze superiori al valore di cut-off **≥ 200 RFU**.

#### NOTA



La Mentype® DIPscreen Allelic Ladder comprende frammenti per ogni allele rilevabile. Confrontare gli alleli con la [Tabella 20](#) e la [Figura 5](#) in appendice.

**Control DNA XY82 (PC)**

Dopo aver verificato un adeguato standard dimensionale, assicurarsi che sia presente un profilo DNA completo con tutti i picchi specifici per il PC, con altezze dei picchi  $\geq 200$  RFU (vedere [Tabella 9](#)). Il Control DNA XY82 è un controllo PCR qualitativo per garantire le prestazioni generali della miscela master.

Il Control DNA XY82 (vedere [Figura 6](#) in appendice), che fa parte del kit per test, rappresenta i seguenti alleli:

**Tabella 9 Genotipo del Control DNA XY82**, - = delezione, + = inserzione

Locus	Control DNA XY82	Locus	Control DNA XY82
<b>Panel FAM (canale blu)</b>		<b>Panel BTG (canale verde)</b>	
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	+/+	<b>Panel nello BTY (canale giallo)</b>	
HLD105	-/-	HLD48	-/-
HLD140	-/+	HLD114	-/-
HLD163	-/+	HLD304	-/+
		HLD131	+/+
		HLD38	+/+
		HLD82	+/+

## Controllo senza template NTC

Dopo aver verificato un adeguato standard dimensionale, controllare che non siano rilevati picchi superiori al cut-off  $\geq 200$  RFU all'interno dell'intervallo bin del NTC (vedere la [Figura 6](#) in appendice).

### NOTA



Utilizzando ChimerisMonitor IVD o GeneMapper™ ID-X insieme ai file modello forniti per Analysis Method, i picchi < 200 RFU non vengono automaticamente assegnati con il nome dell'allele, facilitando così la valutazione dei risultati.

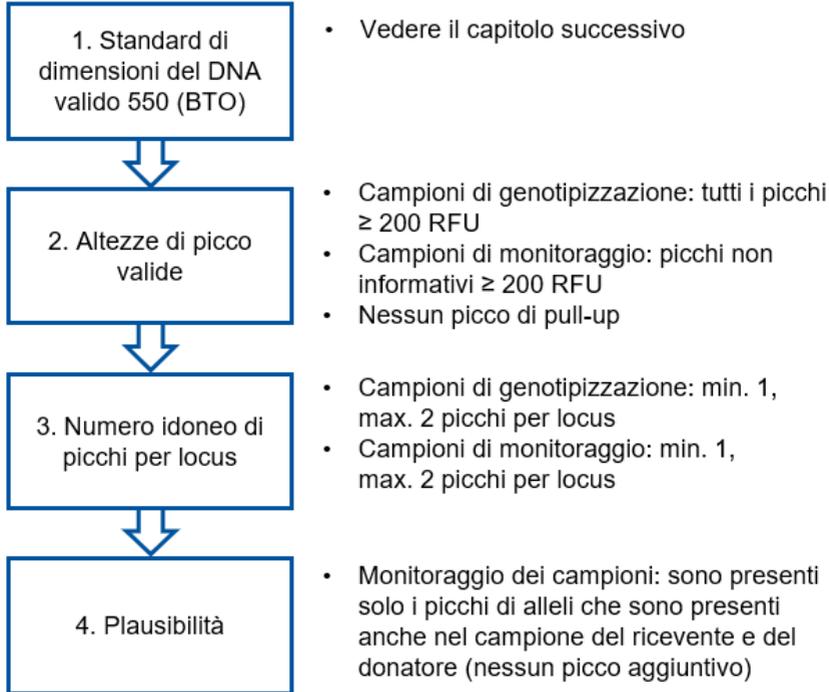
### NOTA



Artefatti, come piccoli accumuli di colorante, possono manifestarsi in modo più evidente all'interno del NTC. Grazie alla base ampia, alla forma anomala e all'assenza di assegnazione del picco, è possibile fare una differenziazione dai picchi degli ampliconi.

## Analisi del campione

### Analisi dei dati del flusso di lavoro



Utilizzando il software ChimerisMonitor IVD, le fasi di convalida descritte per la corsa e i campioni vengono implementate automaticamente.

Utilizzando il software GeneMapper™ ID-X insieme ai modelli specifici forniti da BIOTYPE GmbH, la convalida di base viene eseguita automaticamente.

## Analisi qualitativa - identificazione dei loci informativi

Nella sezione seguente vengono spiegate l'identificazione e la differenziazione dei loci specifici del ricevente. Pertanto, i loci specifici del donatore sono definiti non informativi. L'identificazione dei loci informativi viene effettuata utilizzando i dati del ricevente e del donatore prima del trapianto. Per gli esempi, vedere [Tabella 21](#) - [Tabella 22](#) in appendice.

Utilizzando ChimerisMonitor IVD, il software supporta l'identificazione di loci informativi.

**Loci informativi:** un allele nel campione del ricevente non può essere rilevato nel campione del donatore.

**Loci non informativi:** loci in cui i picchi specifici del ricevente si sovrappongono ai picchi specifici del donatore o loci specifici del donatore.

## Analisi semi-quantitativa - analisi del chimerismo

L'analisi semi-quantitativa del chimerismo viene eseguita come descritto in letteratura, ad esempio: Clark et al. (2015) [1] o Nollet et al. (2001) [2]. Le formule per la quantificazione dipendono dalla costellazione allelica nel locus e sono riportate nella seguente [Tabella 10](#) (adattata da Clark et al.). Il valore di chimerismo viene calcolato per ciascun locus informativo precedentemente selezionato. Quindi si calcola la media di tutti i valori di chimerismo locus-specifici.

### NOTA



Si raccomanda di valutare ciascun  $SD_{\text{Marker}}$  per identificare eventuali valori anomali. Il  $SD_{\text{Marker}}$  per campioni con basso chimerismo misto ( $< 5\% \text{ MC}$ ) non deve superare il 4 %. Per un chimerismo misto da medio ad alto ( $> 5\% \text{ MC}$ ), il  $SD_{\text{Marker}}$  non deve superare il 10 %. Se il  $SD_{\text{Marker}}$  supera i limiti, si raccomanda di rianalizzare i valori di MC dei marker selezionati per identificare eventuali valori anomali.

**Tabella 10 Analisi semi-quantitativa del chimerismo (adattata da Clark et al. [1])**

Scenario 1	Scenario 2
<p><b>Nessun allele condiviso:</b> il ricevente è omozigote, il donatore è omozigote, non ci sono picchi condivisi</p>	<p><b>Un allele condiviso (omozigote):</b> il ricevente è eterozigote, il donatore è omozigote, un picco è condiviso</p>
<p><b>Rapporto ricevente:</b></p> $\% \text{ di chimerismo} = \frac{A}{A+B} \times 100\%$	<p><b>Rapporto ricevente:</b></p> $\% \text{ di chimerismo} = \frac{A}{\left(\frac{B-A}{2}\right)+A} \times 100\%$

## Analisi dei dati con ChimerisMonitor IVD

ChimerisMonitor IVD è un software avanzato per l'analisi automatizzata dei dati, la valutazione dei cicli e il calcolo del chimerismo. Il sistema **Patient Management** integrato permette di monitorare la cinetica del chimerismo con rapporti ad alta risoluzione, nonché con grafici e tabelle.

Per le istruzioni generali sull'analisi dei campioni, consultare le istruzioni per l'uso del software ChimerisMonitor IVD.

Tutti i modelli di analisi richiesti sono inclusi nel sistema **Test Kit Management** di ChimerisMonitor. Questi contengono metodi di analisi e modelli di Bin e Panel collegati. Il software esegue una valutazione generale e integrata del ciclo durante l'importazione del batch, in conformità al capitolo **Convalida dell'esecuzione del flusso di lavoro**. Vedere la [Tabella 11](#) per una descrizione generale del flusso di lavoro di analisi dei dati di ChimerisMonitor.

### NOTA



L'analisi dei dati deve essere eseguita con il software ChimerisMonitor IVD o con il software GeneMapper™ ID-X (Thermo Fisher Scientific). Non è convalidata una valutazione manuale dei file fsa o dei risultati forniti dal software per la raccolta dei dati senza una delle due opzioni software descritte per l'analisi e la valutazione dei dati.

**Tabella 11 Flusso di lavoro per l'analisi del chimerismo con ChimerisMonitor**

N.	Icona	Fase di lavoro
1		Importazione del campione
		<b>Create new patient.</b> Un database di tutti i pazienti creati si trova nella Gestione pazienti
		<b>Batch Import:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Selezionare il kit di test <b>Biotype Mentype DIPscreen</b></li> <li>Tutte le soglie per la corretta valutazione del ciclo e del campione sono collegate al rispettivo metodo di analisi.</li> </ul>

N.	Icona	Fase di lavoro
	 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Importare un ciclo contenente file fsa della scala allelica, del controllo positivo, del controllo senza templat e dei campioni.</li> <li>- Selezionare manualmente i tipi di campione (essenziale per la corretta assegnazione dei picchi e il calcolo del chimerismo)</li> <li>- Il software effettua la valutazione generale del ciclo e del campione</li> </ul> <p>Aprire <b>Batch Import View</b></p> <p><b>Assign Sample:</b> selezionare un campione e assegnarlo al paziente</p>
2	  	<p>Controlli di verifica - ChimerisMonitor esegue una valutazione integrata della qualità e una valutazione del ciclo e del campione</p> <p>Controllare <b>Allelic Ladder Electropherogram</b> e <b>Size Calling Regression</b></p> <p>Sono mostrati eventuali avvisi di qualità:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nella scheda <b>Evaluation of Allelic Ladders</b> durante l'importazione in batch</li> <li>- Nella scheda <b>FSA Import Warnings</b> nell'editor pazienti</li> </ul> <p>Controllare <b>Positive Control Electropherogram</b> e <b>Size Calling Regression</b></p> <p>La <b>Evaluation of Positive and No Template Controls</b> durante l'importazione in batch mostra eventuali avvisi relativi alla qualità.</p> <p>Controllare <b>No Template Control Electropherogram</b> e <b>Size Calling Regression</b></p> <p>La <b>Evaluation of Positive and No Template Controls</b> durante l'importazione in batch mostra eventuali avvisi relativi alla qualità</p>
3	 	<p>Valutazione del campione</p> <p>Controllare il <b>Sample Electropherogram</b></p> <p>Un'assegnazione corretta dei picchi è essenziale per una definizione accurata dei marker informativi e per un solido calcolo del chimerismo.</p> <p>Il controllo <b>Sample Quality</b> della qualità del campione durante l'importazione in batch mostra eventuali avvisi relativi alla qualità</p> <p>Verificare la regressione della chiamata delle dimensioni del campione</p> <p>Il controllo <b>Sample Quality</b> della qualità del campione durante l'importazione in batch mostra eventuali avvisi relativi alla qualità</p>
4		Definizione di marcatori informativi

N.	Icona	Fase di lavoro
		<b>Create a new transplantation:</b> è possibile selezionare marcatori predefiniti per il monitoraggio del paziente
5		<b>Analisi del chimerismo</b>
		<b>Calculate Chimerism:</b> Consultare i marcatori preselezionati per l'analisi del chimerismo ed eseguire il calcolo del chimerismo (chimerismo di un singolo marcatore, chimerismo totale e deviazione standard)
6		<b>Rapporto</b>
		<b>Create Report:</b> i valori singoli e la cinetica del chimerismo vengono visualizzati nel tempo (tabella e grafico) nei formati file pdf o csv)
7		Costruire un sistema basato su database per <b>Patient Management</b>

## Analisi dei dati con GeneMapper™ ID-X

### Preparazione del software GeneMapper™ ID-X

Per istruzioni generali sull'applicazione e sull'analisi dei campioni con questo software, consultare il manuale d'uso del software GeneMapper™ ID-X.

L'assegnazione degli alleli deve essere effettuata con il software di analisi GeneMapper™ ID-X, in combinazione con i file modello del Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit forniti da BIOTYPE GmbH. I file del modello BIOTYPE (vedere [Tabella 12](#)) sono disponibili sulla nostra homepage (<https://www.biotype.de/en/template-files>) per il download o su richiesta scrivendo all'indirizzo e-mail [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de). Il flusso di lavoro per l'analisi del chimerismo con il software GeneMapper™ ID-X è illustrato nella [Tabella 13](#).

**Tabella 12 Modelli BIOTYPE GmbH per il software GeneMapper™ ID-X,**  
modelli specifici per # POP-4™ o l'applicazione § POP-7™

Modello	Nome del modello	
Panels*	DIPscreenIVD_Panel4_v1x <sup>#</sup> DIPscreenIVD_Panel7_v1x <sup>§</sup>	o versioni superiori
Bin Sets*	DIPscreenIVD_Bins4_v1x <sup>#</sup> DIPscreenIVD_Bins7_v1x <sup>§</sup>	o versioni superiori
Size Standard*	BTO_60-550_v1x	o versioni superiori
Analysis Method*	DIPscreenIVD_Analysis4_v1x <sup>#</sup> DIPscreenIVD_Analysis7_v1x <sup>§</sup>	o versioni superiori
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 Alleles Table for 10 Alleles	

\*Questi file modello devono essere sempre utilizzati per l'analisi dei dati.  
Gli altri file modello sono opzionali.

**NOTA**

L'importazione e la chiamata allelica con i file modello forniti è garantita solo se si utilizza il software GeneMapper™ ID-X. Quando si applica il software GeneMapper™, è possibile che si verifichino problemi di importazione con alcuni file modello. Potrebbe essere necessario regolare i pannelli e i bin con uno o più cicli della scala allelica in base alla configurazione specifica del proprio strumento. Per ricevere assistenza, scrivere all'indirizzo ([support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)).

**Tabella 13 Flusso di lavoro per l'analisi del chimerismo con GeneMapper™ ID-X**

N.	Icona	Fase di lavoro										
1		Preparazione del software										
		<b>Panel Manager</b> Importare i file modello forniti per Panel, Bins										
		<b>GeneMapper™ ID-X Manager</b> Importare il modello fornito per Analysis Method e Size Standard										
2		Importazione del campione										
		<b>Add Samples to Project</b> - sfogliare cartella esecuzione, selezionare e <b>Add to List</b> → <b>Add</b>										
3		Analisi del campione										
		Selezionare le seguenti proprietà nelle colonne appropriate del foglio del campione e scegliere <b>Analyze</b> .										
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Nome della colonna</th> <th>Selezionare</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sample Type</td> <td>Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control o Sample</td> </tr> <tr> <td>Analysis Method</td> <td>Selezionare il modello BIOTYPE GmbH precedentemente importato DIPscreenIVD_Analysis_v1x</td> </tr> <tr> <td>Panel</td> <td>Selezionare il modello BIOTYPE GmbH precedentemente importato DIPscreenIVD_Panel_v1x</td> </tr> <tr> <td>Size Standard</td> <td>Selezionare il modello precedentemente importato BIOTYPE GmbH BTO_60-550_v1x</td> </tr> </tbody> </table>	Nome della colonna	Selezionare	Sample Type	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control o Sample	Analysis Method	Selezionare il modello BIOTYPE GmbH precedentemente importato DIPscreenIVD_Analysis_v1x	Panel	Selezionare il modello BIOTYPE GmbH precedentemente importato DIPscreenIVD_Panel_v1x	Size Standard	Selezionare il modello precedentemente importato BIOTYPE GmbH BTO_60-550_v1x
Nome della colonna	Selezionare											
Sample Type	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control o Sample											
Analysis Method	Selezionare il modello BIOTYPE GmbH precedentemente importato DIPscreenIVD_Analysis_v1x											
Panel	Selezionare il modello BIOTYPE GmbH precedentemente importato DIPscreenIVD_Panel_v1x											
Size Standard	Selezionare il modello precedentemente importato BIOTYPE GmbH BTO_60-550_v1x											
4		Verifica dei controlli										
		Verificare la validità del controllo (Allelic Ladder, Positive Control, No Template Control)										
		Con altezze di picco sufficienti, l'assegnazione viene effettuata in base alle specifiche nel Analysis Method										
5		Valutazione del campione										
		Controllare la validità del campione.										

N.	Icona	Fase di lavoro
		<p>Con altezze di picco sufficienti, l'assegnazione viene effettuata in base alle specifiche nel Analysis Method</p> <p>Se i picchi non vengono assegnati nonostante siano state raggiunte altezze sufficienti, è possibile effettuare un'assegnazione manuale. Controllare la plausibilità di tutte le assegnazioni dei picchi.</p>
6		Definizione di marcatori informativi
		Confrontare i genotipi del ricevente e del donatore, quindi identificare manualmente i marcatori informativi (vedere appendice, <u>Esempi di valutazione qualitativa di loci</u> )
7		Analisi del chimerismo
		Esportare la <b>Sizing Table</b> e calcolare i valori di chimerismo secondo la <u>Tabella 10</u> - vedere il capitolo <u>Analisi semi-quantitativa - analisi del chimerismo</u>

**NOTA**

Utilizzando i file modello forniti per Analysis Method, Bins, Panels e selezionando il tipo di campione corrispondente, la validità di questi campioni viene controllata automaticamente dal software. I flag di controllo qualità SOS (Sample off-Scale), SQ (Sizing Quality), OMR (Outside Marker Range) devono essere contrassegnati in verde se la validità è superata.

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

**NOTA**

Utilizzare il Size Match Editor in GeneMapper™ ID-X per valutare lo standard di dimensione. Se la chiamata automatica dei frammenti non è andata a buon fine, le triplette 80 / 90 / 100 bp and 240 / 250 / 260 bp possono essere usate come orientamento nell'assegnazione manuale dei picchi.

## Risoluzione dei problemi

L'analisi post-PCR e l'assegnazione automatica degli alleli con un software di analisi adeguato garantiscono una discriminazione precisa e affidabile degli alleli.

Un calcolo automatico del rapporto DNA donatore/ricevente, nonché delle deviazioni standard e dei limiti di rilevamento, può essere ottenuto direttamente dai dati grezzi di un'analisi delle dimensioni dei frammenti.

Se i risultati ottenuti con Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit devono essere armonizzati con i risultati delle analisi citologiche, assicurarsi che le analisi citologiche siano state eseguite con almeno 200 leucociti.

### Picchi di pull-up

I picchi di pull-up possono verificarsi se le altezze dei picchi sono al di fuori dell'intervallo di rilevamento lineare o se è stata applicata una matrice non corretta. Possono apparire nelle posizioni di picchi specifici in altri pannelli colorati, generalmente con intensità del segnale inferiori. Per un monitoraggio regolare, si consiglia di ripetere la generazione della matrice e verificare un eventuale sovraccarico di DNA.

### Aggiunta di nucleotidi indipendente dal modello

A causa della sua attività di transferasi terminale, la Multi Taq 2 DNA Polymerase tende ad aggiungere un radicale adenosina all'estremità 3' dei frammenti di DNA amplificati. Il picco artefattuale è più corto di una base rispetto al previsto (picchi di -1 bp). Tutti i primer BIOTYPE sono progettati per ridurre al minimo questi artefatti. La formazione di artefatti è ulteriormente ridotta grazie alla fase finale di estensione del protocollo PCR a 68 °C per 60 minuti. L'altezza del picco artefattuale è correlata alla quantità di DNA. I laboratori devono definire individualmente i propri limiti per l'analisi dei picchi.

### Artefatti

La temperatura ambiente può influenzare le prestazioni dei prodotti PCR sugli strumenti multi-capillari, causando la comparsa di picchi spalla o picchi sdoppiati. Inoltre, in alcuni casi l'assegnazione automatica potrebbe essere influenzata. Se si verificano questi effetti, si consiglia di iniettare nuovamente il campione a una temperatura ambiente più elevata ed eventualmente, di utilizzare più di un campione di scala allelica a ogni ciclo.

Artefatti come piccoli accumuli di colorante possono manifestarsi anche nei campioni e, in modo ancora più evidente, all'interno del NTC. Grazie alla base ampia, alla forma anomala e all'assenza di assegnazione del picco, è possibile fare una differenziazione dai picchi degli ampliconi.

### **Deviazioni di pipettaggio**

L'analisi di robustezza del Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ha dimostrato che il kit resiste bene ai piccoli scostamenti dal protocollo descritto (scostamento +/- 10 %). Uno scostamento medio (+/- 20 %) dal protocollo sperimentale descritto può essere più critico per l'analisi del chimerismo misto (in particolare a basse percentuali di chimerismo). È fondamentale prestare particolare attenzione al tampone PCR Reaction Mix A. Uno scostamento del -20 % in questo tampone può comportare una riduzione significativa dell'altezza del segnale o addirittura marcatori non rilevabili. Per ridurre al minimo eventuali deviazioni, si consiglia di utilizzare pipette calibrate, di pipettare con precisione e di miscelare accuratamente.

### **Valori anomali**

Si raccomanda di valutare la deviazione standard all'interno dei marcatori ( $SD_{\text{Marker}}$ ) per identificare i valori anomali. Se il  $SD_{\text{Marker}}$  per campioni a basso chimerismo misto ( $MC < 5\%$ ) supera il 4 % e per campioni a chimerismo misto medio-alto ( $MC > 5\%$ ) il 10 %, si prega di considerare la possibilità di riallizzare i valori MC senza questo valore anomalo specifico.

### **Influenza dei polimeri**

Il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit è stato convalidato e certificato per l'analisi sul polimero POP-4™ and POP-7™.

Quando si utilizza il polimero POP-7™, nella parte anteriore degli elettroferogrammi possono comparire macchie di colorante. In particolare, sono state osservate macchie di colorante fino alla dimensione di 110 bp nel canale blu, che potrebbero influenzare il locus HLD106. Controllare che gli elettroferogrammi non presentino tali effetti prima di eseguire l'analisi del chimerismo.

L'uso di altri polimeri (ad. es. POP-6™) potrebbe influenzare il comportamento di esecuzione di specifici prodotti PCR. Inoltre, il rumore di fondo potrebbe aumentare a causa del diverso comportamento dei coloranti fluorescenti liberi.

## Valutazione delle prestazioni

### Specificità analitica

Abbiamo testato la chiamata automatica degli alleli con la scala allelica e la concordanza dell'assegnazione degli alleli rispetto alla pretipizzazione del DNA del test mediante altri metodi (altri kit PCR) utilizzando il software Genemapper™ ID-X.

Abbiamo valutato ottantuno campioni di DNA pre-caratterizzati, analizzati con il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Sono stati rilevati profili completi con altezze di picco  $\geq 200$  RFU. Dopo aver determinato le impostazioni del dispositivo specifico per il test, a tutti i campioni di DNA è stato assegnato il genotipo corretto per tutti i sistemi DIP e per il marcatore dell'amelogenina. Inoltre, abbiamo valutato la specificità dei primer del Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Non sono stati osservati prodotti di PCR non specifici, garantendo così la specificità dei primer del Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit.

### Interferenti e reazioni incrociate

I potenziali interferenti che potrebbero influenzare i risultati della procedura di misurazione sono stati valutati in linea con le raccomandazioni degli orientamenti CLSI EP07 (terza edizione), EP37 (prima edizione). Per il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, sono stati determinati gli interferenti endogeni ed esogeni, è stata testata la loro massima concentrazione prevista ( $C_{max}$ ) nella reazione di PCR, come suggerito negli orientamenti, e nel caso in cui sia stata osservata un'interferenza, sono state testate ulteriori concentrazioni per determinare la concentrazione alla quale non è rilevabile alcuna interferenza.

I risultati hanno mostrato un effetto di interferenza dell'interferente endogeno del sangue testato al  $2.57E-03$  % v/v nella reazione di PCR sulla misurazione del profilo completo del DNA di un singolo genotipo. Inoltre, sono state osservate deviazioni dal gruppo non trattato per i campioni di chimerismo misto misurati al 2 %, 5 % e 30 % di MC. I risultati erano al di fuori dei limiti di accuratezza, pertanto mostravano interferenze sulla reazione PCR. Tuttavia, la contaminazione da sangue può essere rilevata

visivamente nella reazione di PCR o nella sospensione di DNA isolato da un cambiamento di colore arancione. I professionisti di laboratorio qualificati devono osservare se è presente un cambiamento di colore e ripetere l'isolamento del DNA per evitare eventuali interferenze.

Per quanto riguarda gli interferenti esogeni EDTA, citrato di sodio, etanolo, acido acetilsalicilico, metoclopramide e ciclosporina, non è stato osservato alcun effetto di interferenza ai rispettivi  $C_{max}$ , dove è stato possibile ottenere la misurazione del profilo completo del DNA del singolo genotipo XY1726, e le deviazioni dal gruppo non trattato osservate per i campioni di chimerismo misto misurati al 2 %, 5 % e 30 % di MC rientravano nei limiti di precisione.

Per quanto riguarda gli interferenti esogeni eparina, proteinasi K e metotrexato, è stata osservata un'interferenza al  $C_{max}$  raccomandata da CLSI EP37 (prima edizione). Ulteriori diluizioni sono state testate fino a quando non si sono più rilevate interferenze. Per l'eparina 2,36E- 02 mg/dL, per la proteinasi K 3,22E- 06 % v/v e per il metotrexato 13,6 mg/dL non si sono verificate interferenze.

Sono stati inoltre testati gli anticoagulanti EDTA, sodio citrato ed eparina con i kit di isolamento raccomandati. Non è stato rilevato alcun impatto sulle prestazioni analitiche. Ci aspettiamo che il flusso di lavoro dei kit di isolamento elimini le sostanze interferenti testate provenienti dagli anticoagulanti e dai reagenti per l'isolamento del DNA. Per quanto riguarda l'agente chemioterapico Methotrexate, non ha mostrato alcuna interferenza alla concentrazione testata rispetto al bianco di riferimento.

**Tabella 14 Concentrazioni testate di interferenti endogeni ed esogeni.**

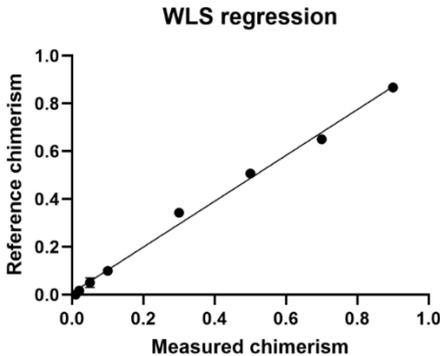
Tipo di interferente	Categoria	Interferente	Concentrazione non interferente
Endogeno	Componenti del sangue intero	Sangue intero	non testato
Esogeno	Anticoagulanti	EDTA	0,099 mg/dL
		Sodio, citrato	8,23E- 05% v/v in PCR
		Eparina	2,36E- 02 mg/dL
	Agenti di isolamento del DNA	Proteinasi K	3,22E- 06% v/v nella reazione PCR
		Etanolo	2,70E- 03% v/v nella reazione PCR
	Analgesici e antipiretici	Aspirina (acido acetilsalicilico)	3 mg/dL
	Agente antiemetico	Metoclopramide	0,225 mg/dL
	Agente chemioterapico	Metotrexato	13,6 mg/dL
Agente immunosoppressore	Ciclosporina	0,18 mg/dL	

## Sensibilità analitica

Il gDNA umano a genotipo singolo è misurabile in un intervallo compreso tra 0,125 ng e 2,00 ng. In questo intervallo è possibile misurare i profili completi di tutti i marcatori DIP e dell'amelogenina senza difetti. Si raccomanda 1,00 ng come quantità ottimale di DNA a genotipo singolo per un'analisi accettabile del profilo completo, riducendo al contempo il consumo di materiale. Per il rilevamento del chimerismo misto con una sensibilità ottimale, abbiamo testato diverse quantità di input. Per evitare una sensibilità limitata per quantità di input ridotte, abbiamo definito 2,00 ng di DNA come quantità di input ottimale per il rilevamento del chimerismo misto.

La linearità è stata valutata in base alla linea guida CLSI - EP06Ed2 (seconda edizione). La linearità è stata testata utilizzando sei diversi campioni di chimerismo misto. Ogni campione di chimerismo misto è stato

diluito in modo da coprire il chimerismo del ricevente dall'1 % al 90 % (1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 %). La deviazione accettabile dalla linearità (ADL) è stata definita con il 4 % per i campioni fino al 10 % di chimerismo del ricevente, per consentire solo deviazioni minori in questo intervallo. Per il chimerismo del ricevente > 10 %, la ADL è stata impostata al 10 % per consentire deviazioni medie dalla linearità. I valori attesi e previsti sono stati inferiori all'ADL per tutti i campioni, confermando la linearità dell'intervallo di misurazione del chimerismo testato.



**Figura 2 Esempio di regressione ponderata di diverse concentrazioni di chimerismo per la miscela di chimerismo 82+1180.** La regressione ha mostrato un coefficiente di determinazione di 0,994, confermando un elevato grado di linearità tra i valori misurati e quelli attesi nell'intero intervallo del test, dall'1 % al 90 % di chimerismo del ricevente.

Il limite del bianco (LoB) è stato testato su 31 DNA a genotipo singolo in tre giorni diversi con due lotti di kit diversi. Il LoB per il chimerismo misto è stato calcolato utilizzando l'approccio non parametrico del CLSI - EP17-A2 ( $\alpha = 0,05$ , seconda edizione). Sono stati analizzati solo i marcatori informativi. Il risultato ha confermato un LoB dello 0,49 %.

Utilizzando una quantità di DNA di 2,00 ng, abbiamo testato tre diversi campioni di chimerismo misto con concentrazioni comprese tra 0,50 % e 3,00 %. Tutti i campioni sono stati analizzati con due diversi lotti di kit. Utilizzando l'analisi Probit (CLSI - EP17-A2, seconda edizione) con un livello di confidenza del 95 %, il limite di rilevazione (LoD) risultante per il lotto 1 è stato dell'1,36 % e dell'1,39 % per il lotto 3. Il risultante LoD riportabile è un chimerismo misto dell'1,39 %.

**Tabella 15 LoD per Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit con marcatori informativi**

Lotto	LoD (% di chimerismo misto)	N <sub>totale</sub>
Lotto 1	1,36 %	252
Lotto 3	1,39 %	252

L'obiettivo di precisione per il limite di quantificazione è stato definito secondo la norma CLSI - EP17-A2 (seconda edizione). Per la rilevazione del chimerismo al LoD abbiamo definito l'obiettivo di precisione utilizzando il modello di Westgard ( $TE = |bias| + 1,96 s$ ; (Westgard et al. 1974 [3])) e il bias e la precisione del test. La deviazione standard risultante, pari allo 0,45 %, è inferiore all'obiettivo di precisione basato su TE dell'1,77 %, confermando un'accuratezza accettabile al LoD.

## Precisione

L'imprecisione e il bias possono variare tra i diversi contenuti di chimerismo. Abbiamo deciso di dividere l'intervallo di chimerismo misto (MC) in tre intervalli, riportati anche da Pettersson et al. (2021) [4] per stabilire criteri di accettazione adattati per ogni intervallo. Gli intervalli sono:

- MC basso con un contenuto < 5 % del secondo genotipo
- MC medio con un contenuto del 5 – 20 % del secondo genotipo
- MC alto con contenuto > 20 % del secondo genotipo

L'analisi dell'accuratezza si è basata sulla linea guida CLSI – EP21Ed2E (seconda edizione). Il bias misurato rispetto al materiale di riferimento e l'imprecisione (riproducibilità) misurata in uno studio multisito sono stati utilizzati per calcolare un valore sigma basato sulla metrica Sigma (Westgard et al. 2018 [3]). Il Total Error accettabile è stato stabilito in base alle stime di bias dello studio di linearità e all'imprecisione riportata per i test PCR basati su STR per l'analisi del chimerismo (Pettersson et al. 2021 [4]). I valori sigma risultanti hanno mostrato una buona accuratezza per l'intervallo MC basso e medio e un'eccellente accuratezza per l'intervallo MC alto.

**Tabella 16 Valori Sigma per il chimerismo misto**

Campione	Valore Sigma
2 % di chimerismo misto	3,08
5 % di chimerismo misto	3,05
30 % di chimerismo misto	4,99

## Esattezza

La valutazione del bias si è basata sul materiale di riferimento di tre diversi fornitori di ring trial (3 diversi programmi di External Quality Control). Il bias è stato calcolato per la differenza tra il risultato del Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit e il valore di riferimento:

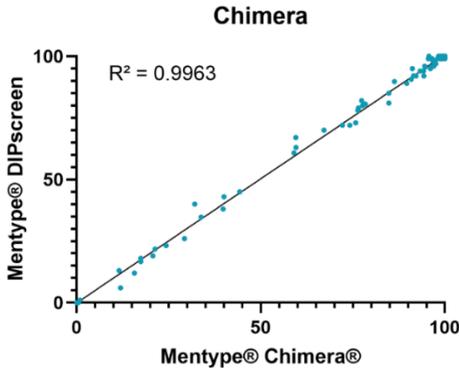
$$\Delta MC = \text{riferimento MC} - \text{Mentype DIPscreen MC}$$

Il calcolo del bias si è basato sulla linea guida CLSI - EP09Ed3cE (terza edizione) e ha utilizzato la media dei valori  $\Delta MC$ , in quanto è stata dimostrata la normalità della distribuzione (test di normalità di Shapiro-Wilk,  $\alpha = 0,05$ ). In base ai valori di riferimento, i campioni sono stati suddivisi nei tre sottointervalli per il chimerismo MC come descritto in precedenza (capitolo Precisione). Il bias risultante variava da -0,68 a 0,74.

**Tabella 17 Bias (media del valore  $\Delta MC$ ) per MC basso, medio e alto**

	MC basso (< 5 %)	MC medio (5 - 20 %)	MC alto (> 20 %)
<b>Bias (media di <math>\Delta MC</math>)</b>	0,54	0,74	-0,68

Oltre alla valutazione dei bias, abbiamo confrontato il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit con un metodo di riferimento. Il metodo di riferimento del Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit basato su PCR analizza il polimorfismo delle brevi ripetizioni in tandem (STR) per distinguere due individui (genotipi). Entrambi i metodi sono stati misurati con 97 campioni di pazienti che rappresentavano un diverso contenuto di chimerismo misto. Il coefficiente di determinazione risultante, pari a 0,9963, ha confermato un'elevata correlazione tra i due metodi.



**Figura 3 Confronto tra i metodi di riferimento di Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit e Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit.** La regressione lineare a destra mostra una correlazione accettabile con un coefficiente di determinazione di 0,9963.

## Precisione

Abbiamo valutato la ripetibilità e la riproducibilità del test in base alle norme ISO 5725-2:2022-05 e CLSI - EP05 (terza edizione). Campioni misti di chimerismo che coprono l'intervallo di misurazione del chimerismo (2 %, 5 %, 30 %, 70 %) sono stati valutati in uno studio multisito 5 x 5 x 3 (giorno x replica x sito). La ripetibilità risultante per il chimerismo misto variava tra lo 0,60 % e l'1,68 % di deviazione standard (SD) del chimerismo misto e la riproducibilità tra lo 0,63 % e l'1,75 % di SD del chimerismo misto.

## Cut-off del test

Abbiamo valutato il cut-off del test per il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit sulla base del calcolo della frequenza allelica dei diversi marcatori amplificati. I campioni di 81 individui sono stati analizzati con il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Le frequenze alleliche risultanti sono state utilizzate per calcolare specifici parametri di discriminazione forense, rilevanti anche per l'analisi del chimerismo, come il contenuto informativo del polimorfismo (PIC), l'eterozigosità prevista (HET) e il potere di discriminazione (PD), che dimostra la capacità di un marcatore genetico o di un insieme di marcatori di distinguere tra diversi individui all'interno di una

popolazione. I valori PIC e HET mostrano gli INDEL altamente polimorfici e l'alto tasso di eterozigotità per il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. La PD per tutti i marcatori DIP varia da 0,5146 a 0,6581, il che tecnicamente consente la discriminazione di due individui sulla base di almeno un marcatore, ma la PD aumenta quando si utilizzano diversi marcatori in combinazione.

**Tabella 18 Probabilità di discriminazione di tutti i marcatori inclusi nel Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit.** PIC, PD e HET sono stati calcolati per ciascun marcatore sulla base dell'analisi di 81 individui.

Marcatore	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

Marcatore	PIC	HET	PD
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
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

## Stabilità durante l'uso

Tutti gli studi di stabilità sono stati pianificati in conformità alla norma ISO 23640:2015 e alla linea guida CLSI EP25 (seconda edizione). Per tutti gli studi di stabilità è stata seguita la seguente procedura: il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit è stato testato in più momenti e per diverse durate. L'analisi dei campioni di chimerismo è stata eseguita utilizzando ChimerisMonitor IVD, il DNA a genotipo singolo di XY1726 e XX1180 rappresentava rispettivamente il ricevente e il donatore.

Abbiamo analizzato DNA a genotipo singolo XY1726 con una quantità di DNA in ingresso di 1 ng e campioni di chimerismo misto (MC) di XY1726:XX1180 (ricevente:donatore) con una quantità di DNA in ingresso di 1 ng che rappresenta i diversi intervalli di MC del 4 % e 30 % di MC. Per la stabilità della miscela master, abbiamo testato i diversi intervalli del 30 %, 5 % e 2 % di MC con input di 1 ng di DNA per il 30 % e il 5 % di MC e input di 2 ng di DNA per il 2 % di MC.

La valutazione finale delle varie condizioni comprendeva il confronto tra le medie del timepoint iniziale ( $t_0$ ) e dei diversi timepoint ( $t_n$ ) ed è stata calcolata utilizzando la seguente equazione:

$$ass. \Delta_n = |\bar{F}_0 - \bar{F}_n|$$

Per lo studio di stabilità all'uso sono stati eseguiti tre esperimenti: uno per testare la stabilità dopo l'esposizione a cicli di congelamento e scongelamento, uno per testare la stabilità dopo diverse manipolazioni della

miscela master e l'altro per testare la stabilità dei kit durante l'uso simulato dopo l'apertura.

Tutti i campioni testati nell'esperimento di stabilità durante l'uso hanno presentato un profilo completo del marcatore per il DNA XY1726 a genotipo singolo e sono risultati al di sotto dei limiti di accuratezza e precisione basati sull'errore totale del test per i tre campioni MC. 30 %, 5 % e 2 % di MC con limiti rispettivamente del 3,31 %, del 3,62 % e dell'1,77 %. Pertanto, il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit non è influenzato da una diversa gestione della miscela master.

Per la stabilità al congelamento e allo scongelamento, il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit non mostra deviazioni critiche inaccettabili da  $T_0$  e un profilo del marcatore completo per il DNA a singolo genotipo XY1726 e risulterebbe al di sotto dei limiti di accuratezza basati sull'errore totale del test per i campioni MC testati: 30 % e 4 % con i loro limiti 3,31 % e 2,85 %. Pertanto, il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit è stabile per un massimo di 20 cicli di congelamento e scongelamento.

In base ai risultati della simulazione d'uso dopo l'apertura, il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit è stabile per l'uso fino a 12 mesi dopo la prima apertura, nonché per un massimo di 20 cicli di congelamento e scongelamento.

## **Dati sulle prestazioni cliniche**

### **Disegno dello studio, aspetti etici e normativi**

Il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit e i metodi di riferimento sono stati testati su campioni di pazienti dopo un trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche. I 10 pazienti inclusi in questo studio sono stati monitorati dopo il trapianto allo-HSCT e il contenuto di donatori dei campioni durante il monitoraggio è stato analizzato 10 volte dopo il trapianto allo-HSCT. Lo scopo di questo studio è stato quello di fornire prove cliniche ai sensi degli articoli 20-24 della legge tedesca sui dispositivi medici "Medizinproduktegesetz" (versione MPG del 7 agosto 2002) (BGBl. I S 3146). Utilizzando il metodo di riferimento citogenetico FISH, è stato necessario dimostrare una concordanza con il metodo PCR basato sul polimorfismo di inserzione-delezione del dispositivo. La conferma della commissione etica responsabile è stata ricevuta il 14/03/2012.

## Metodi di riferimento

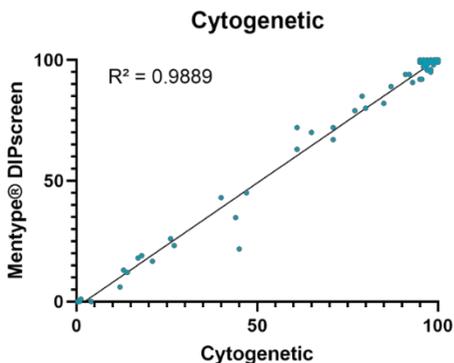
Come metodo di riferimento è stata condotta l'ibridizzazione a fluorescenza in-situ (FISH) utilizzando il CE-IVD CEP® X SpectrumOrange™ / Y SpectrumGreen™ Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden). Per applicare il metodo di riferimento, nello studio sono state incluse solo coppie donatore-destinatario di sesso diverso. Sono stati valutati solo i risultati citogenetici con conta cellulare > 200, secondo le raccomandazioni dei produttori.

## Estrazione e purificazione del DNA

Il DNA è stato isolato utilizzando il QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE). L'isolamento è stato condotto secondo il protocollo del produttore.

## Risultati

L'elevata correlazione tra il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit e il metodo citogenetico di riferimento, con  $R^2 = 0,9889$ , conferma l'applicabilità per il monitoraggio del chimerismo dopo un trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche.



**Figura 4** La correlazione tra i risultati citogenetici e del Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit è evidenziata nel grafico. La regressione lineare mostra una correlazione accettabile con un coefficiente di determinazione di 0,9889 (N = 87)

La concordanza risultante del 94,25 % (5 %  $\Delta$ MC accettato) con i risultati del metodo di riferimento conferma l'affidabilità del Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit per l'interpretazione dei dati clinici.

## Valutazione diagnostica

Le caratteristiche di performance clinica hanno mostrato risultati accettabili. I risultati sono stati valutati in base a un LoD di PCR e citogenetica dell'1 % (Bader et al. 2023 [5]). I parametri per la valutazione della performance clinica in conformità all'allegato I, sez. 9.1b del IVDR sono risultati non completamente applicabili per il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Il dispositivo monitora un intervallo di analiti piuttosto che la presenza di un analita. Pertanto, una valutazione dello stato negativo e positivo dell'analita non è completamente applicabile.

**Tabella 19 Caratteristiche diagnostiche**

Caratteristiche diagnostiche	Stima	Intervallo di confidenza inferiore	Intervallo di confidenza superiore
Sensibilità diagnostica	96,0 %	90,6 %	100,0 %
Specificità diagnostica	76,3 %	62,8 %	89,8 %
Accuratezza diagnostica	87,5 %	80,6 %	94,4 %
Valore predittivo positivo	84,2 %	74,7 %	93,7 %
Valore predittivo negativo	93,5 %	84,9 %	100,0 %
Prevalenza	56,8 %	46,5 %	67,2 %

## Controllo qualità

Tutti i componenti del kit sono sottoposti a un rigoroso processo di garanzia della qualità presso BIOTYPE GmbH. La qualità del kit di test è costantemente monitorata per garantire un utilizzo senza restrizioni. Per qualsiasi domanda in merito alla garanzia di qualità, si prega di contattarci.

## Assistenza tecnica

Per una consulenza tecnica, contattare il nostro team di Customer Support:

**e-mail:** [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)

**telefono:** +49 (0)351 8838 400

## Riferimenti

**[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, *Biochimica 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. Status March 2023 [www.onkopedia.com](http://www.onkopedia.com).

## Limitazioni d'uso

- Le procedure contenute in queste istruzioni per l'uso devono essere seguite come descritto. Eventuali deviazioni possono comportare il fallimento del test o causare risultati errati.
- L'uso di questo prodotto è limitato ai professionisti di laboratorio appositamente istruiti e formati sulle tecniche di PCR e di elettroforesi su gel capillare.
- Per l'esecuzione ottimale di questo test sono necessarie procedure appropriate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni.
- Il kit è stato convalidato solo per l'uso con campioni di sangue intero venoso periferico umano eseguiti con gli strumenti PCR elencati nel capitolo Strumenti e software.
- Questo test non deve essere utilizzato direttamente sul campione. Prima di utilizzare questo test è necessario eseguire metodi di estrazione degli acidi nucleici appropriati.
- La contaminazione dei campioni di DNA con sangue compromette le prestazioni del prodotto. Assicurarsi che non si verifichino contaminazioni durante l'Estrazione del DNA e, se necessario, ripetere l'estrazione.
- Il kit è stato convalidato solo per l'uso insieme agli strumenti descritti nel capitolo Reagenti, kit e materiali di consumo per l'estrazione e la purificazione del DNA.
- Per garantire le prestazioni del kit è necessaria una buona pratica di laboratorio.
- I risultati devono essere interpretati in consultazione con i medici che combinano i risultati delle analisi del chimerismo con i risultati di altri metodi rilevanti per la terapia o la diagnosi.

- L'interpretazione dei risultati deve tenere conto della possibilità di risultati falsi negativi e falsi positivi.
- Il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit non può essere utilizzato se il donatore e il ricevente sono gemelli identici.
- I doppi trapianti non sono stati convalidati nell'ambito della valutazione delle prestazioni.
- I campioni contenenti DNA degradato possono influenzare la capacità di rilevare i loci INDEL/DIP e sesso-specifici.
- Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo non corretto.
- L'analisi del chimerismo è stata convalidata utilizzando marcatori informativi specifici per il paziente (per tutti gli intervalli di chimerismo).
- I campioni provenienti da gruppi etnici diversi possono presentare caratteristiche genetiche distinte, come frequenze alleliche diverse, che potrebbero limitare la potenza della discriminazione o dell'amplificazione. È stata valutata la frequenza allelica di alcuni marcatori DIP in più popolazioni. Il potere combinato di discriminazione è elevato con valori superiori a 0,99. Ciò suggerisce un rischio relativamente basso che il test di un paziente riscontri difficoltà per quanto concerne l'amplificazione. Tuttavia, sono attualmente disponibili dati sulla popolazione per i gruppi caucasici. Non è ancora possibile stimare l'impatto potenziale per altri gruppi etnici.

## Informazioni per l'ordine

Inviare gli ordini via e-mail all'indirizzo [sales@biotype.de](mailto:sales@biotype.de).

Prodotto	Dimensioni della confezione	Numero d'ordine
Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit	25 reazioni	45-12300-0025
	100 reazioni	45-12300-0100
Matrix Standard BT5 multi	1 x 25 µL	45-15100-0025
	2 x 25 µL	45-15100-0050
ChimerisMonitor IVD	licenza demo	46-14800-0000
	licenza di 1 anno	
	licenza di 3 anni	

**NOTA**



I singoli componenti dei kit non possono essere ordinati separatamente.

## **Marchi e dichiarazioni di non responsabilità**

Mentype® e Chimera® sono marchi registrati di BIOTYPE GmbH.

Altri marchi: ABI PRISM®, GeneMapper®, GeneAmp® e Applied Biosystems® (gruppo Applied Biosystems LLC); QIAamp® (Qiagen); POP-4™ (Europa: Applied Biosystems LLC, Stati Uniti: Life Technologies Corporation).

La PCR è protetta da brevetti. I titolari dei brevetti sono Hoffmann-La Roche Inc. e F. Hoffmann-La Roche (Roche).

I nomi registrati, i marchi di fabbrica, ecc. utilizzati nel presente documento, anche se non espressamente contrassegnati come tali, non sono da considerarsi non protetti dalla legge.

Il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit è un kit diagnostico con marchio CE in conformità al regolamento europeo sulla diagnostica in vitro (UE) 2017/746.

Il prodotto non è autorizzato da Health Canada e non è autorizzato o approvato dalla FDA.

Il dispositivo medico non è disponibile in tutti i Paesi.

© 2025 BIOTYPE GmbH; tutti i diritti riservati.

## Spiegazione dei simboli



Produttore



Codice lotto



Contiene una quantità di reagenti sufficiente per <N> test



Consultare le istruzioni per l'uso elettroniche (eIFU)



Data di scadenza



Limite di temperatura



Numero di catalogo



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Tenere lontano dalla luce del sole



Tenere in un luogo asciutto



Identificatore univoco del dispositivo

Ulteriori marcature utilizzate nelle presenti istruzioni per l'uso:

**i**



[testo sottolineato in blu](#)

testo sottolineato in nero

*testo rientrato, corsivo, grassetto*

Consigli utili

Attenzione, assicurarsi di seguire questo avviso!

Link che indirizzano a contenuti esterni come homepage, indirizzi e-mail

Collegamenti incrociati nel documento per una facile navigazione

Campi in cui è necessario fare clic in un software

## Appendice

### Elettroferogrammi di campioni di riferimento

Nelle pagine seguenti sono riportati esempi degli elettroferogrammi di Mentype® DIPscreen Allelic Ladder ([Figura 5](#)), Control DNA XY82 (PC, [Figura 6](#)) e un controllo senza template (NTC, [Figura 7](#)).

Tutti i campioni sono stati amplificati su un termociclatore PCR ProFlex e analizzati su un Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer (POP-4™, 36 cm array) utilizzando il parametro di esecuzione convalidato. L'analisi dei dati è stata eseguita con GeneMapper™ ID-X versione 1.6. Sono stati applicati i modelli Bins, Panels e il Analysis Method conformemente alla [Tabella 12](#).

Gli elettroferogrammi sono ingranditi a una lunghezza dei frammenti di 70 – 420 bp (asse x). L'intervallo generale per l'analisi della lunghezza dei frammenti (asse x) utilizzando il Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit è compreso tra 50 bp e 550 bp. La scala dell'asse y è stata eseguita individualmente in base alla descrizione sotto ogni figura ([Figura 5](#), [Figura 6](#), [Figura 7](#)).

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder

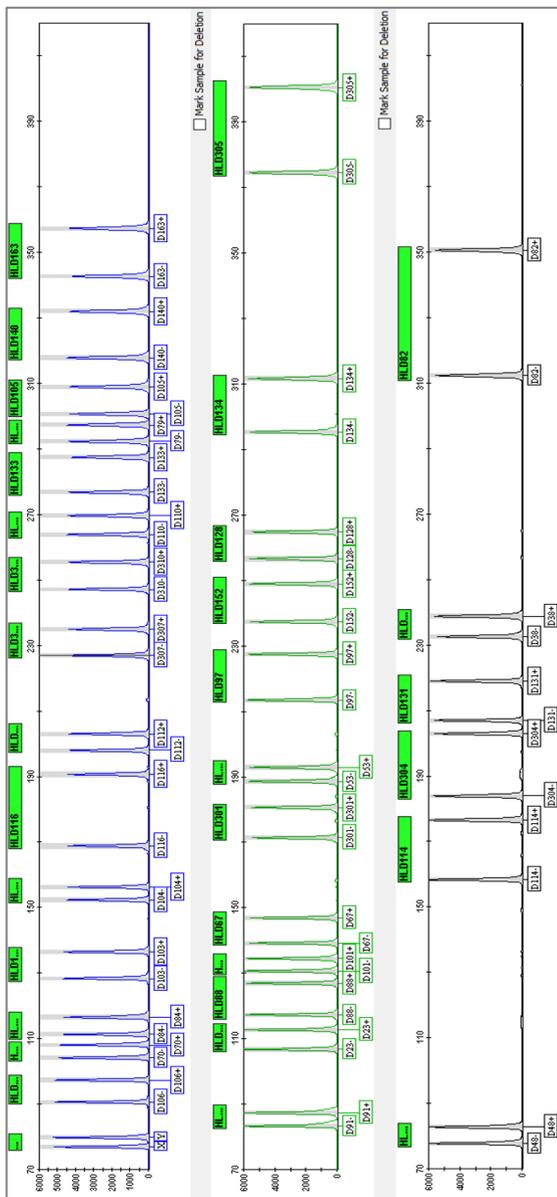


Figura 5 Mentype® DIPscreen Allelic Ladder  
 Fare lo zoom a 6.000 RFU (asse y) e 70 – 420 bp (asse x)

Control DNA XY82 (PC)

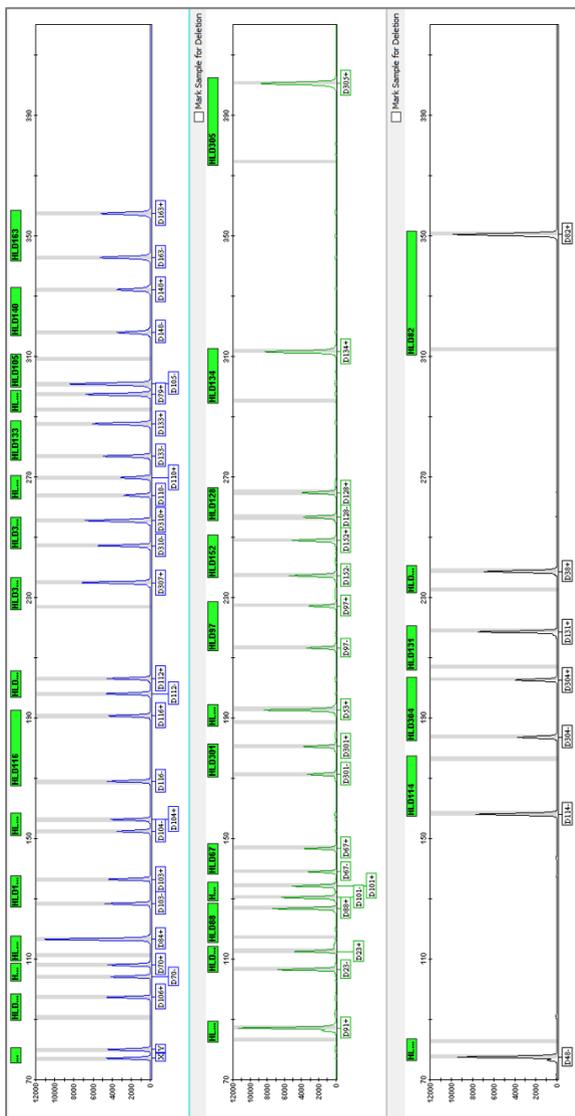


Figura 6 Control DNA XY82 (PC)

Fare lo zoom a 12.000 RFU (asse y) e 70 – 420 bp (asse x)

**Controllo senza template (NTC)**



**Figura 7 Controllo senza template (NTC)**

Fare lo zoom a 1.000 RFU (asse y) e 70 – 420 bp (asse x)

## Lunghezze dei frammenti e degli alleli

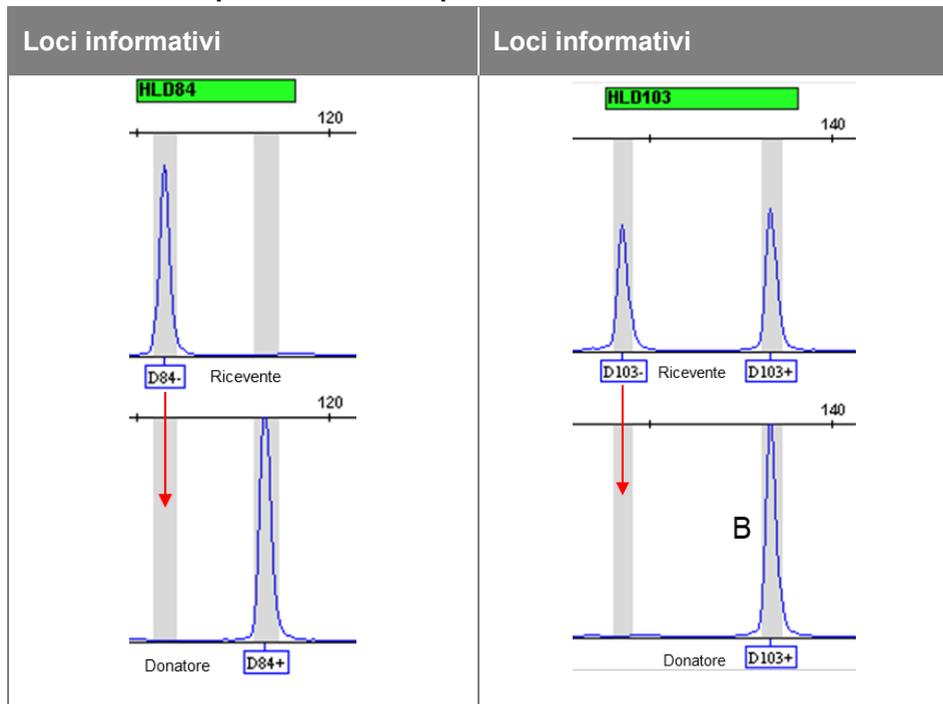
La Tabella 20 mostra le lunghezze dei frammenti dei singoli alleli che si riferiscono al DNA Size Standard 550 (BTO). Tutte le analisi sono state eseguite su un ABI PRISM® 310/3130 Genetic Analyzer con polimero POP-4™. Strumenti di analisi, standard di dimensioni del DNA o polimeri diversi possono determinare lunghezze dei frammenti diverse. Inoltre, si raccomanda un allineamento visivo con la scala allelica.

**Tabella 20 Lunghezze dei frammenti del Mentype® DIPscreen Allelic Ladder analizzati su un ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer con polimero POP-4™, \* arrotondate al numero intero**

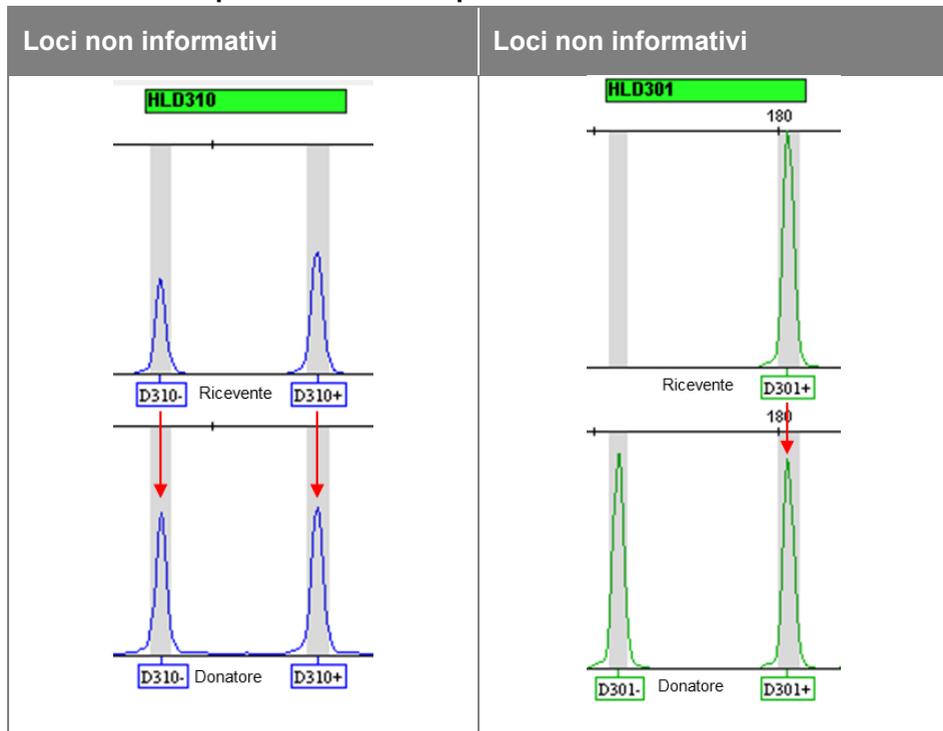
Marcatore/ canale blu	Dimensi one -DIP [bp]*	Dimensio ne +DIP [bp]*	Marcatore /canale verde	Dimensio ne -DIP [bp]*	Dimensio ne +DIP [bp]*
Amelogenin	77 (X)	80 (Y)	HLD91	84	88
HLD106	91	98	HLD23	107	113
HLD70	104	108	HLD88	118	128
HLD84	112	117	HLD101	131	135
HLD103	129	138	HLD67	140	148
HLD104	153	157	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	Marcatore /canale giallo	Dimensio ne -DIP [bp]*	Dimensio ne +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

## Esempi di valutazione qualitativa di loci

Tabella 21 Esempi di valutazione qualitativa dei loci informativi



**Tabella 22 Esempio di valutazione qualitativa di loci non informativi**



---

**BIOTYPE GmbH**

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Telefono: +49 351 8838 400

Fax: +49 351 8838 403

[www.biotype.de](http://www.biotype.de)

**Ordini**

[sales@biotype.de](mailto:sales@biotype.de)

**Assistenza clienti e supporto**

[support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)

