

Mentype® DIPscreen

PCR Amplification Kit

Kullanım Talimatları (IFU)



0483

İn vitro diagnostik kullanım için

DISIFU02v2tr

05.09.2025



45-12300-0025

45-12300-0100



Toplu kod



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

Web sitesi: www.biotype.de

E-posta: support@biotype.de

Sipariş vermek için: sales@biotype.de



Değişiklik Bildirimi

Lütfen önceki IFU sürümüne kıyasla aşağıdaki uyarlamalara dikkat edin:

Belge kodu	Değişiklikler	Tarih
DISIFU02v1tr	İlk sürüm	21.03.2025
DISIFU02v2tr	Kullanım Sınırlamaları bölümünde müdahale başa çıkmanın yanı sıra	05.09.2025

Bu IFU'nun basılı bir versiyonu 7 gün içinde ücretsiz olarak temin edilebilir.

Bu veya diğer sorularınız için lütfen bizimle iletişime geçin:

+49 351 8838 400 numaralı telefonda veya

support@biotype.de

İçerik

Hedeflenen Amaç	4
Bilimsel Arka Plan	4
Ürün Açıklaması	5
Sağlanan malzemeler	7
Kit içeriği	7
Bileşenlerin Tanımı	8
Reaktif saklama ve işleme	8
Gerekli olan ancak sağlanmayan malzeme ve cihazlar	9
Genel laboratuvar ekipmanları	9
Reaktifler, kitler ve sarf malzemeleri	10
Cihazlar ve yazılım	11
Numuneler ve Test Örnekleri	12
Uyarılar ve Önlemler	12
Kullanıcıya uyarı	13
Prosedür	14
DeneySEL iş akışına genel bakış	14
Örnek Hazırlama	14
Ham numune gereksinimleri	14
DNA ekstraksiyonu	15
DNA miktar tayini ve seyreltme	15
DNA depolama	16
Kontrol hazırlığı	16
Pozitif kontrol PC	16
Şablon kontrolü yok NTC	17
Ana miks kurulumu	17
PCR amplifikasyonu	19
Kapiler jel elektroforezi	20
PCR ürünlerinin hazırlanması	20

Parça uzunluğu analizi	22
Veri Analizi.....	24
Veri analizi için genel prosedür	24
İş akışı çalıştırma doğrulaması.....	25
DNA Size Standard 550 (BTO).....	25
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder	26
Control DNA XY82 (PC)	26
Şablon kontrolü yok NTC.....	27
Örnek Analiz.....	28
İş akışı veri analizi	28
Kalitatif analiz - bilgilendirici lokusların tanımlanması	29
Yarı-kantitatif analiz – kimerizm analizi	29
ChimerisMonitor IVD ile Data analysis.....	31
GeneMapper™ ID-X ile Data analysis	33
GeneMapper™ ID-X Software hazırlanması	33
Sorun Giderme	36
Performans Değerlendirmesi.....	38
Klinik performans verileri	47
Kalite Kontrol	50
Teknik Destek.....	50
Referanslar	50
Kullanım Sınırlamaları	51
Sipariş bilgileri	52
Ticari Markalar ve Feragatnameler	53
Sembollerin Açıklanması	54
Ekler	56

Hedeflenen Amaç

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, allojenik hematopoetik kök hücre transplantasyonu (allo-HSCT) geçirmiş yetişkin lösemi hastalarından toplanan periferik venöz tam kan örneklerinden ekstrakte edilen genomik DNA ile kullanılmak üzere tasarlanmış manuel bir testtir.

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, 33 delesyon ekleme polimorfizmini (DIP) ve amelogenin'i tek bir multipleks PCR reaksiyonunda tespit eder. HSCT öncesinde, bu polimorfizmler hasta ve donörün genotiplerinin kalitatif taraması ve hastaya özgü DIP alellerinin belirlenmesi için kullanılır. Bu bilgilendirici aleller, allo-HSCT sonrasında yarı kantitatif kimerizm takibi gerçekleştirmek için analiz edilir.

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, moleküler genetik teknikler, multipleks PCR ve Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems bölümü) Genetic Analyzers kullanımı konusunda eğitimli profesyonel kullanıcılar için tasarlanmıştır.

Bilimsel Arka Plan

Allojeneik hematopoetik kök hücre nakli (allo-HSCT), lösemi gibi malign olmayan ve malign hematolojik hastalıkları olan hastaları iyileştirmek için bir tedavi seçeneğidir. Kimerizm analizi, greft reddinin erken belirtilerini tespit etmek için allo-HSCT alıcılarında donör ve alıcı hematopoetik hücrelerin karışımını belirlemek için kullanılır. İnsan periferik venöz kanı genotipleme ve izleme için kullanılır. CLSI Kılavuzlarına göre (MM05-A2 2. Baskı) kan alımı için EDTA ve sitrat gibi antikoagülanlar önerilmektedir. Transplantasyonun başarısına bağlı olarak farklı hematopoetik kimerizm biçimleri (tam, karışık veya kayıp) gelişebilir. Kimerizm analizi için floresan in situ hibridizasyon (FISH), kısıtlama parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP), kan sayımı analizi ve PCR tabanlı yöntemler dahil olmak üzere farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır. Ekleme-silme polimorfizmlerinin (INDEL veya DIP'ler) analizi, multipleks PCR yaklaşımlarıyla yarı kantitatif kimerizm analizinin yanı sıra qPCR veya dPCR platformlarında alele özgü uygulama ile kantitatif analize olanak tanır. Bu nedenle, bu tür DIP testleri hassas bir kimerizm takibi için ön koşuldur. Greft reddinin erken belirtilerini tespit etmek için

düzenli aralıklarla ve allo-HSCT'den kısa bir süre sonra kimerizm analizi yapılmalıdır.

Ürün Açıklaması

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, kimerizm takibi için geliştirilmiş bir multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyon kitidir. Verici-alıcı ayrımı için, çok yüksek heterozigotluk oranına ve 19 kromozom üzerinde dengeli bir alel dağılımına (bkz. [Tablo 1](#)) sahip iki alelli ekleme-silme polimorfizmleri (INDEL veya DIP'ler) tek bir PCR reaksiyonunda eşzamanlı olarak çoğaltılır. Her bir lokus için bir primer 6-FAM™, BTG veya BTY floroforu ile etiketlenmiştir. PCR ürünleri daha sonra kapiler jel elektroforezi ile analiz edilir.

Tablo 1 Lokusa özgü bilgiler Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, HLD = İnsan Lokusu DIP, -DIP = Silme, +DIP = ekleme

DIP Lokusu	Kromozomal pozisyon	DIP Lokusu
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	-/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
HLD163	12q24.31	-/AACTACGGCAGCCCC
BTG Panel		
HLD91	11q14.1	-/GATA
HLD23	18p11.32	-/CTTTAA
HLD88	9q22.33	-/CCACAAGA
HLD101	15q26.1	-/GTAG
HLD67	5q33.3	-/CTACTGAC
HLD301	17q21.32	-/CAGGGGCTC
HLD53	3q22.1	-/ATGT

DIP Lokusu	Kromozomal pozisyon	DIP Lokusu
HLD97	13q13.1	-/AGAGAAAGCTGAAG
HLD152	16p13.2	-/TGGTCAAAGGCA
HLD128	1q31.3	-/ATTAAATA
HLD134	5q11.2	-/ATGATGGTTTCAGA
HLD305	20q11.22	-
		/CAAGGTCCCACCACACTCGCGTGGA
BTY Panel		
HLD48	2q11.2	-/GACTT
HLD114	17p13.2	-/TCCTATTCTACTACTGAAT
HLD304	9q34.3	-/GAGCTGCTCAAGAGAGGAGG
HLD131	7q36.2	-/TTGGGCTTATT
HLD38	1q32.2	-/TAGTT
HLD82	7q21.3	-/ACCTCCTACTCCTTGGTCTATTCCTG
		GTCACATGTACT

Test, 200'den fazla HLA uyumlu akraba donör-alıcı çiftinin kimerizm analizi ile doğrulanmış ve karşılaştırmalı bir klinik değerlendirme çalışmasında uygunluğu teyit edilmiştir.

Kalitatif analiz için tespit limiti 125 pg genomik DNA'dır.

Standart koşullar altında karışık kimerizm tespiti için giriş aralığı 1,0 - 2,0 ng gDNA'dır. Standart koşullar altında optimum gDNA girişi 2 ng'dır.

Bilgilendirici belirteçlerin analizi için girdi olarak 2 ng gDNA kullanılarak %1,4 LoD₉₅ (Tespit Sınırı) hassasiyet elde edilebilir. Yukarıda belirtilen hassasiyete ulaşmak için mümkün olduğunca çok sayıda bilgilendirici belirteç kullanılması tavsiye edilir.

Sağlanan malzemeler

Kit içeriği

Tablo 2 Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit içerik

Reaktif	Kapak rengi		Ambalaj boyutu başına hacim	
			25 reaksiyon	100 reaksiyon
Nuclease-Free Water	Açık mavi		1,5 mL	2 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Mor		125 µL	500 µL
Mentype® DIPscreen Primer Mix	Kırmızı		125 µL	500 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Beyaz		15 µL	60 µL
Control DNA XY82 (2 ng/µL)	Beyaz		10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Turuncu		13 µL	50 µL
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder	Yeşil		25 µL	25 µL

Bileşen parti numaralarına genel bir bakış, kutu kapağının iç tarafında bulunan etikette bulunabilir.

NOT

Lütfen ambalaj boyutunun, gerekli kontrol sayısını veya pipetleme için gerekli fazlalığı hesaba **katmadan** test sayısını tanımladığını unutmayın.

i

İlgili verim için aşağıdaki boyutu kullanmanızı öneririz:

- pCR çalışması başına < 8 örnek: 25 reaksiyon ambalaj boyutu
- pCR çalışması başına ≥ 8 örnek: 100 reaksiyon ambalaj boyutu

Bileşenlerin Tanımı

Nuclease-Free Water: PCR sınıfı su, PCR kurulumunda ve şablon kontrolü (NTC) olarak kullanılır.

Reaction Mix A: DNTP'ler ve $MgCl_2$ içeren PCR tamponu. PCR tamponu, PCR için enzim aktivitesini destekleyecek şekilde optimize edilmiştir.

Mentype® DIPscreen Primer Mix: etiketli primer (etiket: 6-FAM™, BTG, BTY) ve etiketsiz primerler içeren multipleks oligonükleotid primer karışımı.

Multi Taq 2 DNA Polymerase sıcak başlangıç Taq DNA polimeraz, 2,5 U/ μ L.

Control DNA XY82 (2 ng/ μ L): tek kaynaklı bir insan erkeğinin EDTA-kanından izole edilen genomik DNA. DNA, Mentype® DIPscreen Amplification Kit için kalitatif, harici pozitif kontrol olarak kullanılacaktır.

NOT

i

Control DNA XY82, saflaştırılmış, tehlikeli olmayan ve aktif biyolojik işlevleri olmayan bireysel DNA moleküllerinden oluştuğu için laboratuvar uzmanları için kritik değildir. Doğrudan tehdit oluşturabilecek hiçbir canlı hücre veya patojenik organizma içermez.

DNA Size Standard 550 (BTO): 60 - 550 bp arasında tanımlanmış parça uzunluklarına sahip florofor etiketli PCR parçalarının karışımı, bileşen parça uzunluğu analizinden önce her PCR ürününe eklenir, PCR ürünlerinin parça uzunluğunu tam olarak belirlemek için bir boyut regresyonu için kullanılır.

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder tahlil tarafından tespit edilen tüm alelleri temsil eden yapay PCR ürünlerinin karışımı, tam alel tanımlaması için bir genotipleme referansı olarak kullanılır.

Reaktif saklama ve işleme

Kit kuru buz üzerinde gönderilir. Reaktifin donmasını önleyen bir tampon içinde saklanan Multi Taq 2 DNA Polymerase hariç, kitin bileşenleri donmuş olarak gelmelidir.

Lütfen teslim aldıktan sonra kitin eksiksiz olup olmadığını kontrol edin. Varışta çözülmüş olan kitleri kullanmayın. Bir veya daha fazla bileşen donmamışsa veya sevkiyat sırasında tüpler veya ambalaj zarar görmüşse, performans garanti edilemez.

Tüm bileşenleri -25 °C ila -15 °C arasında, ışıktan koruyarak saklayın. Özellikle Mentype® DIPscreen Primer Mix, DNA Size Standard 550 (BTO) ve Mentype® DIPscreen Allelic Ladder ışıktan korunarak saklanmalıdır.

Kontaminasyonu önlemek için, amplifikasyon öncesi bileşenlerin (DNA örnekleri, Control DNA XY82) ve amplifikasyon sonrası bileşenlerin DNA Size Standard 550 (BTO) ve Mentype® DIPscreen Allelic Ladder) PCR reaktiflerinden Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A ve Mentype® DIPscreen Primer Mix) ayrı olarak saklanmasını ve kullanılmasını öneririz.

Kitin son kullanma tarihi, kit kutusu etiketindeki bilgilere göre veya açıldıktan 12 ay sonra (hangisi önce gelirse) sona erecektir. Maksimum 20 donma-çözülme döngüsünü aşmayın.

Gerekli olan ancak sağlanmayan malzeme ve cihazlar

Genel laboratuvar ekipmanları

- 2 mL ve 200 µL reaksiyon tüpleri için rotorlu masaüstü santrifüj
- Mikrotitre plakaları için rotorlu santrifüj 96 kuyulu reaksiyon plakaları için
- Vorteks karıştırıcı
- Atılabilir aerosol geçirmez filtre uçlarına sahip kalibre edilmiş ayarlanabilir pipetler
- Uygun 200 µL 96 kuyulu reaksiyon plakaları veya 200 µL reaksiyon tüpleri, ilgili kapatma malzemesi ile birlikte, PCR sınıfı
- 2 mL ve 200 µL reaksiyon tüpleri için uygun raflar
- 2 mL tüpler için uygun soğutma rafı
- Tek kullanımlık pudrasız eldivenler
- NanoDrop™ One Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific) veya Qubit Florometre (Thermo Fisher Scientific)

NOT**i**

PCR için kullanılan tüm malzemeler uygun kalitede olmalıdır (DNA içermeyen ve moleküler biyoloji için). Lütfen kullanılan tüm cihazların üreticinin talimatlarına ve tavsiyelerine uygun olarak kurulduğundan, kalibre edildiğinden, kontrol edildiğinden ve bakımının yapıldığından emin olun.

Reaktifler, kitler ve sarf malzemeleri**Tablo 3 Gerekli ancak sağlanmayan reaktifler**

Reaktif	Tedarikçi	Sipariş numarası
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
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

Cihazlar ve yazılım

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit aşağıdaki PCR döngüleyicileriyle kullanılmak üzere onaylanmıştır:

- ProFlex PCR System (cat. no.: 4484073 (3 x 32 kuyulu örnek bloğu), 4484075 (96 kuyulu örnek bloğu), Thermo Fisher Scientific)
- GeneAmp® PCR System 9700 Silver (üretimi durdurulmuştur, cat. no. N805-0200, Thermo Fisher Scientific)
- Mastercycler nexus gradient (cat. no.: 6331000017, Eppendorf AG)
- Biometra Tadvanced (cat. no.: 846-2-070-214, Analytik Jena)

Testi gerçekleştirmek için yukarıda listelenen cihazlardan yalnızca biri gereklidir.

Daha önce belirtilenler dışındaki araçların uygulanması kullanıcı tarafından onaylanmalıdır. Aşağıdaki özellikler yerine getirilmelidir:

- Isıtmalı kapak
- 200 µL reaksiyon plakaları / tüpleri için uygun blok
- Rampa 4 - 5 °C/s'ye kadar ayarlanabilir

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit aşağıdaki cihaz ve ayarlarla kullanılmak üzere doğrulanmıştır:

- Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), software version 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

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit aşağıdaki yazılımlarla kullanılmak üzere onaylanmıştır. Verileri analiz etmek ve değerlendirmek için aşağıda listelenen yazılımlardan yalnızca biri gereklidir. Veri analizi ve değerlendirmesi için açıklanan iki yazılım seçeneğinden biri olmadan fsa dosyalarının manuel olarak değerlendirilmesi veya veri toplama yazılımı ile verilen herhangi bir sonuç doğrulanmamıştır.

- ChimerisMonitor IVD, sürüm 3.0.x (BIOTYPE GmbH)
- GeneMapper™ ID-X yazılımı, sürüm 1.6(Thermo Fisher Scientific), ürüne özgü kullanılarak:
 - AnalysisMethod: DIPscreenIVD_Analysis4_v1x veya DIPscreenIVD_Analysis7_v1x
 - Bin: DIPscreenIVD_Bins4_v1x veya DIPscreenIVD_Bins7_v1x
 - Panel: DIPscreenIVD_Panel4_v1x veya DIPscreenIVD_Panel7_v1x
 - Size Standard: BTO_60-550_v1x

NOT



Lütfen kullanılan tüm cihazların üreticinin talimatlarına ve tavsiyelerine uygun olarak kurulduğundan, kalibre edildiğinden, kontrol edildiğinden ve bakımının yapıldığından emin olun.

Numuneler ve Test Örnekleri

Aşağıdaki numuneler Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ile doğrulanmıştır:

- İzleme ve genotipleme için insan periferik venöz tam kanından (EDTA, sitrat, heparin) izole edilen genomik DNA.

İzole edilen gDNA seyreltilmeden -25 °C ila -15 °C'de saklanmalıdır.

NOT



Lütfen kan almak için kullanılan antikoagülanın DNA izolasyon kiti üreticisinin talimatlarıyla uyumlu olduğundan emin olun.

Uyarılar ve Önlemler

- Ürünü kullanmadan önce Kullanım Talimatlarını dikkatlice okuyun.
- Tüm BIOTYPE ürünleri için güvenlik bilgi formlarını(SDS) ve Tehlikesiz İfadeleri (NHS) okuyun; bunlar talep üzerine veya ana sayfamızdan (www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter). Bir SVHC içermedikleri

veya 1272/2008 (CLP) Yönetmeliğinin diğer kısıtlamalarına tabi oldukları için SDS gerektirmeyen ürünler için BIOTYPE talep üzerine SDS sağlar.

- Lütfen gerekli malzemelerin ve reaktiflerin üreticileriyle iletişime geçin, ancak ek olarak gerekli reaktiflerin SDS kopyaları için sağlanmamıştır.
- Farklı kit partilerine ait kit bileşenleri karıştırılmamalıdır.
- Kit bileşenlerinin başka reaksiyon kaplarına alınmasına izin verilmez.
- Bu ürünün kullanımı, moleküler genetik teknikler, multipleks PCR ve Thermo Fisher Scientific Genetic Analyzers kullanımı konusunda eğitim almış profesyonel laboratuvar kullanıcıları ile sınırlıdır.
- İlk kullanımdan önce ürünü ve bileşenlerini kontrol edin:
 - Bütünlük
 - Sayı, tür ve dolum açısından eksiksizlik (bkz. bölüm Sağlanan malzemeler)
 - Doğru etiketleme
 - Varışta donmuşluk (Multi Taq 2 DNA Polymerase hariç)
- Numuneler her zaman güvenli laboratuvar prosedürleri ve iyi laboratuvar uygulamalarına uygun olarak bulaşıcı ve/veya biyolojik tehlikeli olarak değerlendirilmelidir.
- Son kullanma tarihi geçmiş bir kiti kullanmayın.
- Numuneleri ve tahlil atıklarını yerel güvenlik yönetmeliklerinize göre atın.
- Kullanılan tüm cihazlar üreticinin talimat ve tavsiyelerine göre kurulmuş, kalibre edilmiş, kontrol edilmiş ve bakımı yapılmıştır.

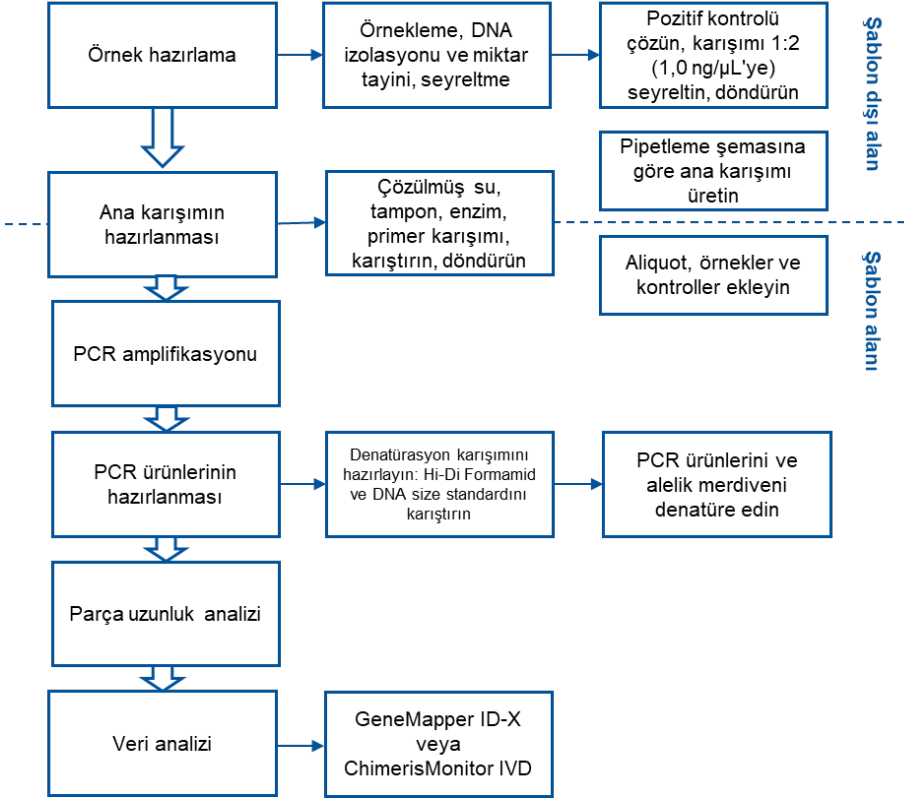
Kullanıcıya uyarı

Ürünle ilgili olarak ortaya çıkan herhangi bir sorun kullanıcı tarafından üreticiye bildirilmelidir. Bu kitle ilgili her türlü ciddi olay üreticiye ve kullanıcının ve/veya hastanın bulunduğu üye devletlerin uygun makamlarına bildirilmelidir.

Güvenlik ve Performans Özeti (SSP), 2017/746 sayılı Tüzüğün (AB) 29. Maddesi uyarınca oluşturulmuştur ve EUDAMED veritabanı aracılığıyla, bu ürün söz konusu olduğunda yalnızca laboratuvar uzmanları olmak üzere hedeflenen kullanıcılara cihazın güvenlik ve performansına ilişkin verilerin güncellenmiş bir özetine kamu erişimi sağlamayı amaçlamaktadır.

Prosedür

Deneyisel iş akışına genel bakış



Örnek Hazırlama

Ham numune gereksinimleri

Aşağıdaki prosedür için en az 200 µL periferik venöz tam kan örneği alın.

Ham numune materyalinin (periferik venöz tam kan) işlenmesi, tam kanın oda sıcaklığında (22 °C ila 25 °C) 24 saate kadar veya 2 °C ila 6 °C'de

72 saat veya daha uzun süre saklanabileceğini belirten Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) kılavuzu MM05-A2 (2. baskı) tavsiyesine uygun olmalıdır. Ayrıca, tam kan alımı için kullanılan antikoagülanların EDTA, sitrat veya heparin olması önerilir.

NOT



Ham numune materyalinin uzun süre depolanması genetik materyalin parçalanmasına ve dolayısıyla materyalin kalitesinin yetersiz kalmasına yol açabilir. Bu, örneğin eksik profiller yoluyla analiz sonucunu kötüleştirebilir.

DNA ekstraksiyonu

Periferik venöz tam kan örneklerinden DNA ekstraksiyonu ve saflaştırma işlemini üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirin. Aşağıdaki kitler, ürünün performans değerlendirmesinin bir parçası olarak doğrulanmıştır:

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit
- Macherey-Nagel NucleoSpin® Dx Blood, Kandan DNA için CE sertifikalı Mini Kit

NOT



Kan kontaminasyonu PCR reaksiyonunda veya izole edilen DNA'da turuncu renk değişimi ile görsel olarak tespit edilebilir. Bir renk değişikliği gözlenirse, herhangi bir potansiyel paraziti önlemek için DNA izolasyonunu tekrarlamanızı öneririz.

NOT



Nükleik asidin elüsyonundan önce her türlü etanol izini ortadan kaldırdığınızdan emin olun. Etanol güçlü bir PCR inhibitörüdür.

DNA miktar tayini ve seyreltme

DNA konsantrasyonunu NanoDrop spektrofotometre kullanarak 260 nm'de UV/VIS spektroskopisi veya Qubit™ Fluorometre kullanarak floresan spektroskopisi ile ölçün.

Spektrofotometri kullanırken, boşluğu ölçmek için DNA ekstraksiyon kitindeki elüsyon tamponunu kullanın. A_{260}/A_{280} oranı 1,7 - 1,9 aralığında, A_{260}/A_{230} oranı ise 1,8 - 2,3 aralığında olmalıdır.

DNA'nın florometrik kantifikasyonu için Qubit 1x dsDNA HS Assay-Kit veya Qubit dsDNA BR Kit ile Qubit™ Fluorometer kullanılabilir.

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ile kullanım için DNA örneklerini 2,0 ng/μL optimum konsantrasyona seyreltin. Kullanmadan önce seyreltmeyi taze olarak hazırlayın. Seyreltici olarak nükleaz içermeyen su kullanın.

NOT



Kit için toplam girdi aralığı reaksiyon başına 0,125 - 2,0 ng DNA'dır, **optimum girdi** en yüksek hassasiyet için standart koşullar altında reaksiyon başına 2 ng DNA'dır. 0,125 ng'nin altındaki bir giriş eksik profillere, daha yüksek bir giriş ise pull-up piklerine yol açabilir.

DNA depolama

DNA, uzun süreli saklama için seyreltilmeden -25 °C ila -15 °C'de veya DNA izolasyon kitinin üretici bilgilerine göre saklanmalıdır.

Kontrol hazırlığı

Pozitif kontrol PC

Control DNA XY82'yi çözdüren, vorteksleyerek homojenize edin ve ardından kısa bir santrifüjleme yapın.

Nuclease-Free Water kullanarak Control DNA XY82 'yi 1:2 oranında 2,0 ng/μL'den 1,0 ng/μL'ye seyreltin.

Seyreltilmiş PC'yi kısa süreli vorteksleme ile homojenize edin. Bundan sonra, seyreltilmiş PC' yi kısa bir süre santrifüjleyin (yaklaşık 10 saniye). Seyreltilmiş pozitif kontrolü saklamayın.

NOT



Her zaman Control DNA XY82'nin yeni bir seyreltmesini uygulayın.

Şablon kontrolü yok NTC

Kitte bulunan Nuclease-Free Water örnek yerine şablon kontrolü (NTC) olmadan uygulayın.

Ana miks kurulumu

Ana karışım kurulumu için Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit aşağıdaki bileşenleri çıkarın:

- Nuclease-Free Water (açık mavi kapak)
- Reaction Mix A (mor kapak)
- Mentype® DIPscreen Primer Mix (kırmızı kapaklı)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (beyaz kapaklı)

Tüm dondurulmuş bileşenler oda sıcaklığında (22 °C ila 28 °C, yaklaşık 30 dakika, ışıktan korunarak) çözülmeli ve tüpler ters çevrilerek veya hafifçe vortekslenerek homojenize edilmelidir. Bundan sonra reaktifleri kısa bir süre santrifüjleyin (yaklaşık 10 saniye). İyi laboratuvar uygulamaları ilkelerini korumak için, ana karışım kurulumundan önce Multi Taq 2 DNA Polymerase mümkün olduğunca uzun süre soğutulmuş bir ortamda (örn. soğutma rafı) tutulması tavsiye edilir.

NOT



Multi Taq 2 DNA Polymerase daha uzun süre stabil kalması için çırparak karıştırın - **enzimi vortekslemeyin.**

PCR ana karışımını **Tablo 4** 'e göre özel bir temiz alanda test edilecek toplam numune sayısı için uygun boyutta bir mikrosantrifüj tüpünde hazırlayın. Hesaplamanıza en az bir PC ve bir NTC dahil edin.

NOT

Genel bir kural olarak, 10'dan az numuneyi test ediyorsanız, fazladan bir numune için yeterli master karışımı kullanın. 10 veya daha fazla numuneyi test ediyorsanız, + %10'luk bir fazla reaktif ana karışım hacmi kullanın.

Tablo 4 PCR ana karışım reaksiyonu kurulumu, * Hacim DNA konsantrasyonuna bağlıdır. Daha yüksek hacimde DNA şablonu kullanılırsa Nuclease-Free Water hacmini ayarladığınızdan emin olun. Toplam reaksiyon (rxn) hacmi her zaman 25,0 µL olmalıdır.

Bileşen	Hacim		
	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
DNA şablonu veya kontrol örneği	1,0 µL*	5 x 1,0 µL*	10 x 1,0 µL*
Toplam hacim	25,0 µL	125,0 µL	250,0 µL

Ana karışımı hafifçe vorteksleyerek karıştırın, ardından karışımı kısa bir süre santrifüjleyin.

Hazırlanan 200 µL PCR tüplerine 24,0 µL PCR master karışımı alın ve kapalı tüpleri kısa bir süre santrifüjleyin.

DNA şablonlarının ve kontrollerinin uygulanması

PCR ana karışımı içeren hazırlanmış PCR tüplerine aşağıdaki örnek türlerinden 1,0 µL ekleyin.

NTC: numune yerine 1,0 µL Nuclease-Free Water ekleyin.

Örnek: hazırlanmış, seyreltilmiş gDNA örneklerinden 1,0 µL ekleyin (2,0 ng/µL).

PC: örnek yerine 1,0 µL hazırlanmış, 1:2 oranında seyreltilmiş Control DNA XY82 (1,0 ng/µL) ekleyin.

NOT



İlk olarak, kontrolün kirlenmesini önlemek için NTC 'yi hazırlayın. Örneklerin çapraz kontaminasyonunu önlemek için PC' yi en son hazırlayın.

NOT



Çalışma başına en az bir pozitif kontrol (PC) ve bir şablon yok kontrolü (NTC) kullanın. Aksi takdirde, çalışma doğrulanamaz.

Tüm PCR tüplerini kapatın, hafifçe vorteksleyin ve döndürün.

PCR amplifikasyonu

PCR döngüleyiciyi aşağıdaki amplifikasyon profili ile programlayın, rampayı 4 - 5 °C/s olarak ayarladığınızdan emin olun. Polimerazı aktive etmek ve spesifik olmayan amplifikasyon ürünlerinin oluşmasını önlemek için "sıcak başlangıç" PCR'si gerçekleştirin.

Tablo 5 PCR protokolü

Sıcaklık	Zaman	
94 °C	4 dakika	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	28 döngü
72 °C	75 s	
68 °C	60 dakika	
10 °C	∞	Tutun

NOT



Ayarlanabilir ısıtma ve soğutma adımlarına sahip termal döngüleyiciler kullanılıyorsa, optimum sinyal dengesini sağlamak için **rampa 4 - 5 °C/s'ye ayarlanmalıdır.**

NOT



Farklı PCR cihazlarının kurulumu, programlanması ve bakımı ile ilgili temel bilgiler için lütfen ilgili cihazın kullanım kılavuzuna bakın.

NOT



Çok küçük miktarlarda DNA, istatistiksel düşüşlere ve tepe noktalarında dengesizliklere neden olabilir. PCR döngülerinin sayısının artırılması, minimum miktardaki safsızlıkların neden olduğu çapraz kontaminasyon riskini artırır. Ayrıca, spesifik olmayan amplifikasyon ürünleri ortaya çıkabilir.

Kapiler jel elektroforezi

PCR ürünlerinin hazırlanması

PCR tamamlandıktan sonra örnekleri döngüleyiciden çıkarın ve kısa bir süre santrifüjleyin.

NOT



PCR tamamlandıktan sonra PCR ürünleri 2 °C ila 8 °C'de 4 haftaya kadar veya -25 °C ila -15 °C'de ışıktan korunarak uzun süreli saklanabilir.

Reaktifleri çözdürün, karıştırın ve santrifüjleyin:

- Hi-Di™ Formamid (kite dahil değildir)
- Mentype® DIPscreen Allelic Ladder (yeşil kapak)
- DNA Size Standard BTO (550) (turuncu kapak)

Tablo 6' da açıklanan denatürasyon karışımını hazırlayın ve pipetleme farklılıklarını telafi etmek için bir veya iki reaksiyon ekleyin. Alel merdiveni için ekstra bir reaksiyon ekleyin.

Tablo 6 Denatürasyon karışımı

Bileşen	Reaksiyon başına hacim
Hi-Di™ Formamide	12,0 µL
DNA Size Standard BTO (550)	0,5 µL

Bir PCR plakasının (Genetic Analyzer kullanıma uygun) kuyucuklarına 12,0 µL denatürasyon karışımı pipetleyin.

Kuyucuklara 1,0 µL PCR ürünü veya 1,0 µL Mentype® DIPscreen Allelic Ladder ekleyin. PCR plakasını uygun bir folyo ile kapatın, vorteksleyin ve plakayı kısa bir süre santrifüjleyin.

NOT



Alel merdiveni, veri analizi sırasında analiz edilen parçaları doğru bir şekilde belirlemek için kullanılır. Her parça uzunluğu analizi çalışmasında, başarılı veri değerlendirmesini sağlamak için alel merdiveni en az bir kez analiz edilmelidir.

NOT



Jel elektroforez cihazının kılcal damarları asla kurumamalıdır. Numuneler tüm kapiler pozisyonları kaplamıyorsa, plakanın ilave kuyularını kapiler numarasına göre 12,0 µL Hi-Di™ Formamide ile doldurun.

Hazırlanan PCR ürünlerini bir PCR döngüleyicide 95 °C'de 3 dakika denatüre edin ve ardından örnekleri döngüleyicide 4 °C'ye soğutun. Parça uzunluğu analizinden önce örnekleri kısa bir süre santrifüjleyin.

Parça uzunluğu analizi

İlk parça uzunluğu analizini gerçekleştirmeden önce, Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit (6-FAM™, BTG, BTY, BTO) için kullanılan floresan boya ların spektral hizalamasını gerçekleştirmek üzere Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE GmbH) çalıştırın.

NOT



Kurulumu için Matrix Standard BT5 multi kullanım talimatlarına bakın. Bunlara www.biotype.de/en/ifus adresinden veya talep üzerine support@biotype.de adresinden BIOTYPE GmbH aracılığıyla ulaşılabilir.

Matrix Standard BT5 multi başarıyla çalıştırıldıktan sonra, 3500 Series Genetic Analyzer için sağlanan cihaz ayarlarını Tablo 7'de açıklandığı gibi içe aktarın (www.biotype.de/en/template-files).

Tablo 7 Sağlanan dosyalar için Genetic Analyzers

(www.biotype.de/en/template-files)

3500 Series Genetic Analyzers

Instrument Protocol	POP-4™, 36 cm capillary array: DIPscreenIVD_Instrument436.xml POP-7™, 50 cm capillary array: DIPscreenIVD_Instrument750.xml
Size Standard Protocol	BTO_60-550_SizeStandard.xml
Sizecalling Protocol	BTO_60-550_Sizecalling.xml
Assay	POP-4™, 36 cm capillary array: DIPscreenIVD_Assay436.xml POP-7™, 50 cm capillary array: DIPscreenIVD_Assay750.xml

Gerekli cihaz protokolüne ilişkin teknik özellikler Tablo 8'de açıklanmaktadır. Sadece tanımlanan parametreler ayarlanmalıdır, diğer parametreler varsayılan ayarda kalmalıdır. Belirli çalışma parametrelerini ayarlamak için üreticinin kullanım talimatlarını izleyin.

Tablo 8 Farklı kapiler jel elektroforez cihazlarının çalıştırma modülleri için parametreler

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

Tablo 8 'de verilen değerlerden farklı olarak, çalışma süresi kullanılan kapiler dizi uzunluğuna göre ayarlanabilir, ancak DNA Size Standard 550 (BTO). tüm parçalarının (60 - 550 bp) analiz edilmesi zorunludur.

Bir Size Standard protocol kurmak için DNA Size Standard 550 (BTO) için aşağıdaki boyutlar turuncu panele atanmalıdır:

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 ve 550 bp.

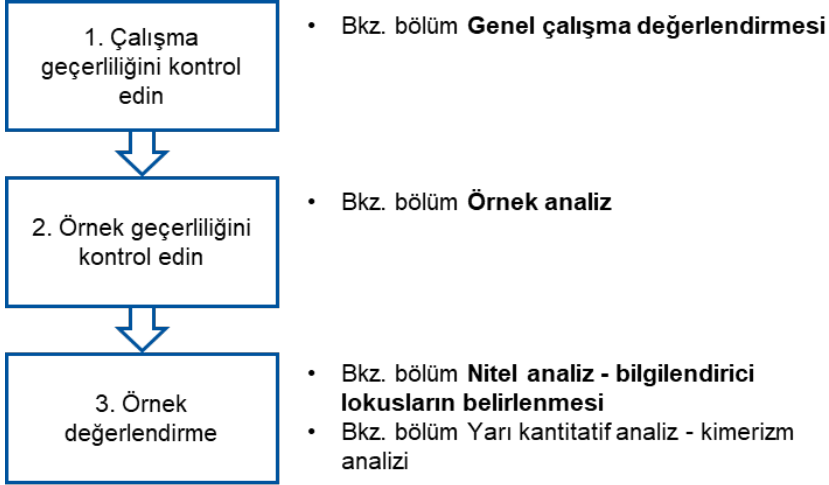
NOT



BIOTYPE GmbH, GeneMapper™ ID-X 'in basit bir yazılım kurulumu için analiz şablonlarının yanı sıra parça uzunluğu analizi için belirli çalıştırma ayarlarının kolay kurulumu için özel şablonlar sağlar. Bu şablonlar şu adresten indirilebilir: www.biotype.de/en/template-files.

Veri Analizi

Veri analizi için genel prosedür

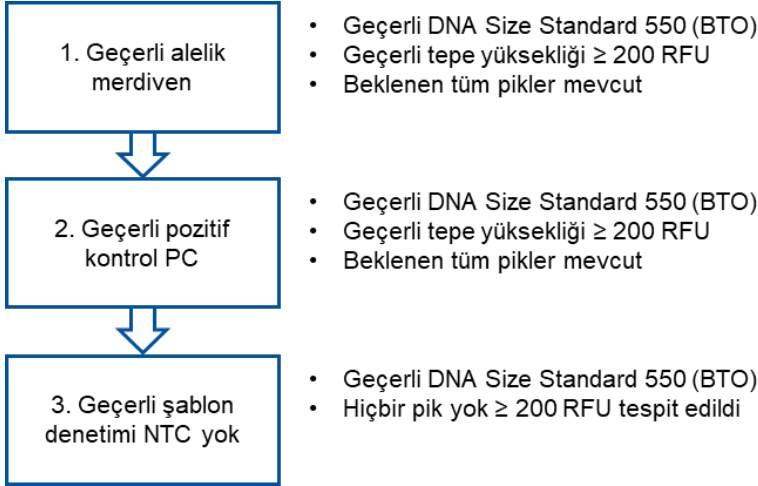


NOT



Veri analizi ya ChimerisMonitor IVD Yazılımı ya da GeneMapper™ ID-X Yazılımı (Thermo Fisher Scientific ile gerçekleştirilmelidir. Veri analizi ve değerlendirmesi için açıklanan iki yazılım seçeneğinden biri olmadan fsa dosyalarının manuel olarak değerlendirilmesi veya veri toplama yazılımı ile verilen herhangi bir sonuç doğrulanmamıştır.

İş akışı çalıştırma doğrulaması



NOT



Geçerliliği değerlendirmek için 50 - 560 bp ölçüm aralığı analiz edilmelidir.

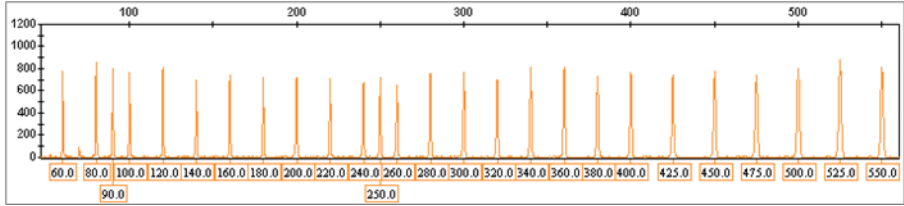
DNA Size Standard 550 (BTO)

Çoğaltılmış ürünlerin tam uzunluklarının bulunması cihaz tipine, elektroforez koşullarına ve kullanılan DNA boyut standardına bağlıdır. Bazı lokusların karmaşıklığı nedeniyle, boyut belirleme eşit olarak dağıtılmış referanslara dayanmalıdır.

Aşağıdaki kriterler için tüm örneklerde DNA Size Standard 550 (BTO) kontrol edin:

- Tüm parçaların mevcudiyeti: **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 ve 550 bp**
- Tüm fragmanlar, kesme ≥ 50 RFU'nun üzerinde pik yükseklikleri ile mevcuttur

- Belirleme katsayısı $R^2 > 0,995$.
- Parçalar, artan parça uzunluğu ile pik yüksekliğinde sürekli olarak azalmaz.



Şekil 1 Elektroferogramı DNA Size Standard 550 (BTO), uzunlukları bp cinsinden olan fragmanlar

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder

Geçerli bir boyut standardı sağladıktan sonra, alel merdiveninde bulunan tüm piklerin ≥ 200 RFU kesme değerinin üzerinde pik yükseklikleri ile mevcut olup olmadığını kontrol edin.

NOT

i

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder, tespit edilebilen her alel için parçalar içerir. Lütfen alelleri ekteki [Tablo 20](#) ve [Şekil 5](#) ile karşılaştırın.

Control DNA XY82 (PC)

Geçerli bir boyut standardı sağladıktan sonra, PC için tüm spesifik piklerin tam bir DNA profilinin ≥ 200 RFU pik yükseklikleri ile mevcut olduğundan emin olun (bkz. [Tablo 9](#)). Control DNA XY82, genel olarak ana karışım performansını sağlamak için kalitatif bir PCR kontrolüdür.

Test kitinin bir parçası olan Control DNA XY82 (bkz. ek [Şekil 6](#)) aşağıdaki alelleri temsil eder:

Tablo 9 Genotipi Control DNA XY82, - = Silme, + = Ekleme

Locus	Control DNA XY82	Locus	Control DNA XY82
FAM Panel (mavi kanal)		BTG Panel (yeşil 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 (sarı kanal)	
HLD105	-/-	HLD48	-/-
HLD140	-/+	HLD114	-/-
HLD163	-/+	HLD304	-/+
		HLD131	+/+
		HLD38	+/+
		HLD82	+/+

Şablon kontrolü yok NTC

Geçerli bir boyut standardı sağladıktan sonra, NTC 'nin bölme aralığı içinde kesme ≥ 200 RFU 'nun üzerinde hiçbir pik tespit edilmediğini kontrol edin (bkz. ek Şekil 6).

NOT**i**

ChimerisMonitor IVD veya GeneMapper™ ID-X Analysis Method için sağlanan şablon dosyalarıyla birlikte kullandığınızda, 200 RFU'dan küçük piklere otomatik olarak alel adı atanmaz ve bu sayede sonuçları kolayca değerlendirebilirsiniz.

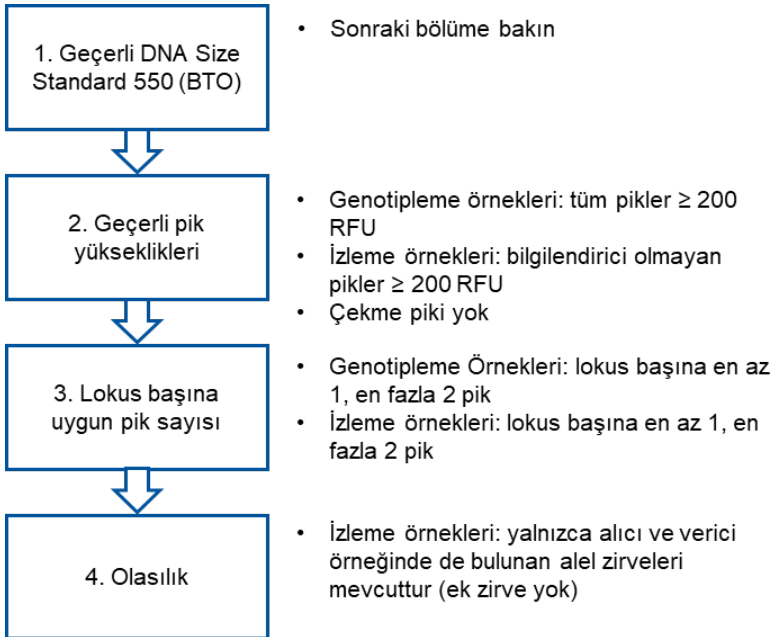
NOT



Küçük boya lekeleri gibi artefaktlar NTC içinde daha belirgin olarak ortaya çıkabilir. Geniş pik tabanı, anormal pik şekli ve pik ataması olmaması nedeniyle, ampikon piklerinden ayırt etmek mümkündür.

Örnek Analiz

İş akışı veri analizi



ChimerisMonitor IVD yazılımı kullanılarak, çalışma ve numuneler için açıklanan doğrulama adımları otomatik olarak uygulanır.

GeneMapper™ ID-X yazılımı, BIOTYPE GmbH tarafından sağlanan özel şablonlarla birlikte kullanılarak temel doğrulama otomatik olarak yapılır.

Kalitatif analiz - bilgilendirici lokusların tanımlanması

Bir sonraki bölümde, alıcıya özgü lokusların tanımlanması ve farklılaştırılması açıklanmaktadır. Bu nedenle, donöre özgü lokuslar bilgilendirici olmayan olarak tanımlanmıştır. Bilgilendirici lokusların tanımlanması, alıcı ve donörden nakil öncesinde alınan veriler kullanılarak gerçekleştirilir. Örnekler için ekteki [Tablo 21](#) - [Tablo 22](#)'ye bakınız.

ChimerisMonitor IVD kullanılarak, bilgilendirici lokusların tanımlanması yazılım tarafından desteklenmektedir.

Bilgilendirici Lokuslar: Alıcı örnekteki bir alel, donör örneğinde tespit edilemez.

Bilgilendirici olmayan lokuslar: Alıcıya özgü pik(ler)in donöre özgü pik(ler) ile örtüştüğü lokuslar veya donöre özgü lokuslar.

Yarı-kantitatif analiz – kimerizm analizi

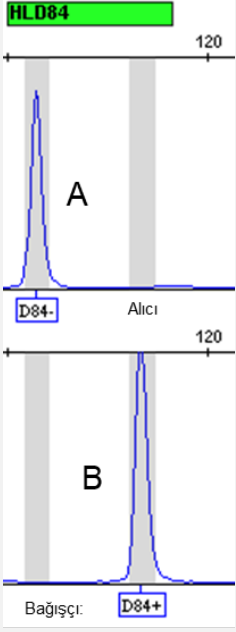
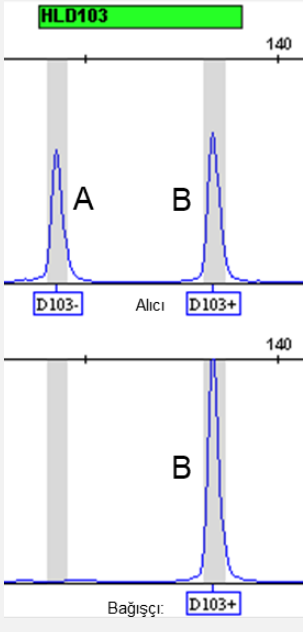
Yarı-kantitatif kimerizm analizi literatürde açıklandığı gibi gerçekleştirilir, örneğin Clark et al. (2015) [1] veya Nollet vd. (2001) [2]. Tablo 10 (Clark et al. uyarlanmıştır). Kimerizm değeri önceden seçilen her bilgilendirici lokus için hesaplanır. Ardından, tüm lokusa özgü kimerizm değerlerinin ortalaması hesaplanır.

NOT



Aykırı değerlerin belirlenmesi için her bir SD_{Marker} değerlendirilmesi önerilir. Düşük karışık kimerizm örnekleri için ($< 5\%$ MC) $SD_{Marker} \%4$ 'ü geçmemelidir. Orta ila yüksek karışık kimerizm için ($> 5\%$ MC) $SD_{Marker} \%10$ 'u geçmemelidir. SD_{Marker} sınırları aşarsa, seçilen markörlerin MC değerlerinin aykırı değerler için yeniden analiz edilmesi önerilir.

Tablo 10 Yarı kantitatif kimerizm analizi (şuradan uyarlanmıştır Clark ve diğerleri [1])

Senaryo 1	Senaryo 2
paylaşılan alel yok: alıcı homozigot, verici homozigot, hiçbir tepe noktası paylaşılmıyor 	paylaşılan bir alel (homozigot): alıcı heterozigot, verici homozigot, bir tepe noktası paylaşılır 
Alıcı oranı: $\text{kimerizm} = \frac{A}{A+B} \times 100\%$	Alıcı oranı: $\text{kimerizm} = \frac{A}{\left(\frac{B-A}{2}\right) + A} \times 100\%$

ChimerisMonitor IVD ile Data analysis

ChimerisMonitor IVD, otomatik veri analizi, çalışma değerlendirmesi ve kimerizm hesaplaması için gelişmiş bir yazılımdır. Entegre **Patient Management** sistemi, kimerizm kinetiğini yüksek çözünürlüklü raporlarda, aynı zamanda grafiklerde ve tablo görselleştirmesinde izlemeye olanak tanır.

Numune analizine ilişkin genel talimatlar için ChimerisMonitor IVD yazılımı kullanım talimatlarına bakın.

Tüm gerekli analiz şablonları ChimerisMonitor **Test Kit Management** sisteminde yer almaktadır. Bunlar analiz yöntemlerinin yanı sıra bağlantılı Bin ve Panel şablonlarını içerir. Yazılım, toplu içe aktarma sırasında İş akışı çalıştırma doğrulaması bölümüne göre genel, entegre bir çalışma değerlendirmesi gerçekleştirir. ChimerisMonitor veri analizi iş akışının genel bir açıklaması için Tablo 11'e bakın.

NOT

i

Veri analizi ya ChimerisMonitor IVD Yazılımı ya da GeneMapper™ ID-X Yazılımı (Thermo Fisher Scientific ile gerçekleştirilmelidir. Veri analizi ve değerlendirmesi için açıklanan iki yazılım seçeneğinden biri olmadan fsa dosyalarının manuel olarak değerlendirilmesi veya veri toplama yazılımı ile verilen herhangi bir sonuç doğrulanmamıştır.

Tablo 11 Kimerizm analizi iş akışı ile ChimerisMonitor

No.	Simge	Çalışma adımı
1	Örnek İçe Aktarma	
		Create new patient. Oluşturulan tüm hastaların bir veritabanı Hasta Yönetiminde temsil edilir Batch Import: - Test kitini seçin Biotype Mentype DIPscreen
		Doğru çalışma ve numune değerlendirmesi için tüm eşikler ilgili analiz yöntemiyle bağlantılıdır. - Alel merdiveni, pozitif kontrol, şablon kontrolü yok ve örneklerin fsa dosyalarını içeren bir çalıştırmayı içe aktarın.

No.	Simge	Çalışma adımı
		- Örnek türlerini manuel olarak seçin (doğru pik ataması ve kimerizm hesaplaması için gereklidir) - Genel çalışma ve numune değerlendirmesi yazılım tarafından gerçekleştirilir
		Açın Batch Import View
		Assign Sample: Bir numune seçin ve hastaya atayın
2		Kontrolleri kontrol edin - ChimerisMonitor, entegre bir kalite değerlendirmesinin yanı sıra bir çalışma ve numune değerlendirmesi gerçekleştirir
		Kontrol edin Allelic Ladder Electropherogram ve Size Calling Regression Olası kalite uyarıları görüntülenir:
		- Sekme içinde Evaluation of Allelic Ladders toplu İçe Aktarma sırasında - Hasta Düzenleyicisi'ndeki FSA Import Warnings sekmesi içinde
		Kontrol edin Positive Control Electropherogram ve Size Calling Regression Bu Evaluation of Positive and No Template Controls toplu İçe Aktarma sırasında olası kalite uyarılarını görüntüler.
		Kontrol edin No Template Control Electropherogram ve Size Calling Regression Bu Evaluation of Positive and No Template Controls toplu İçe Aktarma sırasında olası kalite uyarılarını görüntüler
3		Sample evaluation
		Kontrol edin Sample Electropherogram Doğru bir pik ataması, bilgilendirici belirteçlerin doğru bir şekilde tanımlanması ve sağlam bir kimerizm hesaplaması için gereklidir.
		Bu Sample Quality Toplu İçe Aktarma sırasında yapılan kontrol, olası kalite uyarılarını görüntüler Regresyon Çağırın Örneklemin Boyutunu Kontrol Edin Bu Sample Quality Toplu İçe Aktarma sırasında yapılan kontrol, olası kalite uyarılarını görüntüler
4		Bilgilendirici işaretleyicilerin tanımı
		Create a new transplantation: hasta takibi için önceden tanımlanmış belirteçler seçilebilir
5		Kimerizm Analizi
		Calculate Chimerism:

No.	Simge	Çalışma adımı
		Kimerizm analizi için önceden seçilmiş belirteçlere bakın ve kimerizm hesaplamasını gerçekleştirin (tek markör kimerizmi, toplam kimerizm ve standart sapma)
6	Rapor	
		Create Report: Tek değerler ve kimerizm kinetiği zaman içinde görüntülenir (tablo ve grafik, dosya biçimi pdf veya csv)
7		Aşağıdakiler için veritabanına dayalı bir sistem oluşturun Patient Management

GeneMapper™ ID-X ile Data analysis

GeneMapper™ ID-X Software hazırlanması

Bu yazılımla uygulama ve numune analizi hakkında genel talimatlar için lütfen GeneMapper™ ID-X Yazılımı kullanım kılavuzuna bakın.

Allel dağılımı, BIOTYPE GmbH 'nin Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit şablon dosyaları ile birlikte GeneMapper™ ID-X analiz yazılımı ile gerçekleştirilecektir. BIOTYPE şablon dosyaları (bkz. [Tablo 12](#)) ana sayfamızda mevcuttur (<https://www.biotype.de/en/template-files>) adresinden indirebilirsiniz veya talep üzerine support@biotype.de. GeneMapper™ ID-X yazılımı kullanılarak yapılan kimerizm analizi iş akışı [Tablo 13](#)'te gösterilmektedir.

Tablo 12 BIOTYPE GmbH için şablonlar GeneMapper™ ID-X Yazılım için özel şablonlar #POP-4™ veya § POP-7™ uygulaması

Şablon	Şablon adı	
Panels*	DIPscreenIVD_Panel4_v1x [#] DIPscreenIVD_Panel7_v1x [§]	veya daha yüksek sürümler
Bin Sets*	DIPscreenIVD_Bins4_v1x [#] DIPscreenIVD_Bins7_v1x [§]	veya daha yüksek sürümler
Size Standard*	BTO_60-550_v1x	veya daha yüksek sürümler
Analysis Method*	DIPscreenIVD_Analysis4_v1x [#] DIPscreenIVD_Analysis7_v1x [§]	veya daha yüksek sürümler
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 Alleles Table for 10 Alleles	

*Veri analizi için her zaman bu şablonlar kullanılmalıdır. Diğer şablon dosyaları isteğe bağlıdır.

NOT**i**

Sağlanan şablon dosyalarıyla içe aktarma ve alel arama yalnızca GeneMapper™ ID-X yazılımı kullanıldığında garanti edilir. GeneMapper™ yazılımı uygulandığında bazı şablon dosyalarında içe aktarma sorunları yaşayabilirsiniz. Özel cihaz kurulumunuzda allelik merdivenin bir veya daha fazla çalıştırılmasıyla panelleri ve kutuları ayarlamanız gerekebilir. Destek için bize ulaşın (support@biotype.de).

Tablo 13 Kimerizm analizi iş akışı ile GeneMapper™ ID-X

No.	Simge	Çalışma adımı
1	Yazılım Hazırlama	
		Panel Manager Import the provided template files for Panel, Bins
		GeneMapper™ ID-X Manager Şunlar için sağlanan şablonu içe aktarın Analysis Method ve Size Standard
2	Örnek İçe Aktarma	

No.

Simge

Çalışma adımları



Add Samples to Project

- browse for run folder, select and **Add to List** → **Add**

3

Örnek Analiz

Örnek sayfanın uygun sütunlarında aşağıdaki özellikleri seçin ve **Analyze**.

Sütun Adı	Seçiniz
Sample Type	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control or Sample
Analysis Method	Daha önce içe aktarılan BIOTYPE GmbH şablonu DIPscreenIVD_Analysis_v1x
Panel	Daha önce içe aktarılan BIOTYPE GmbH şablonu DIPscreenIVD_Panel_v1x
Size Standard	Daha önce içe aktarılan BIOTYPE GmbH şablon BTO_60-550_v1x

4

Kontrolleri kontrol edin



Kontrol geçerliliğini kontrol edin (Allelic Ladder, Positive Control, No Template Control)



Yeterli tepe yükseklikleri ile atama, aşağıdaki spesifikasyonlara göre gerçekleştirilir Analysis Method

5

Sample evaluation

Check sample validity.



Yeterli tepe yükseklikleri ile atama, aşağıdaki spesifikasyonlara göre gerçekleştirilir Analysis Method



Yeterli yüksekliğe ulaşılmasına rağmen tepe noktaları atanmamışsa, manuel bir atama mümkündür. Lütfen tüm zirve atamalarını inandırıcılık açısından kontrol edin.

6

Bilgilendirici işaretleyicilerin tanımı



Alıcı ve Donörün genotiplerini karşılaştırın, ardından bilgilendirici belirteçleri manuel olarak tanımlayın (Lokusların nitel değerlendirmesine yönelik örnekler bakınız)

7

Kimerizm Analizi

No.	Simge	Çalışma adımı
-----	-------	---------------



Dışa aktar **Sizing Table** ve kimerizm değerlerini Tablo 10'a göre hesaplayın - bkz. Bölüm Yarı-kantitatif analiz – kimerizm analizi

NOT



Analysis Method, Bins, Panels için sağlanan şablon dosyaları kullanılarak ve ilgili örnek türü seçilerek, bu örneklerin geçerliliği yazılım tarafından otomatik olarak kontrol edilir. Kalite kontrol bayrakları SOS (Sample off-Scale), SQ (Sizing Quality), OMR (Outside Marker Range) geçerlilik için yeşil kutular olmalıdır.

ARNM	SOS	SQ	SSPK	MIX	OMR	CGQ
☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒

NOT



Size standardını değerlendirmek için GeneMapper™ ID-X 'teki Size Match Editor kullanın. Otomatik parça çağırma başarısız olursa, 80 / 90 / 100 bp ve 240 / 250 / 260 bp uçluları manuel pik atamasında bir yönlendirme için kullanılabilir.

Sorun Giderme

PCR sonrası analiz ve uygun analiz yazılımı ile otomatik alel ataması, alellerin kesin ve güvenilir bir şekilde ayırt edilmesini sağlar.

Donör/alıcı DNA oranının otomatik olarak hesaplanmasının yanı sıra standart sapmalar ve tespit limitleri doğrudan bir parça boyutu analizinin ham verilerinden elde edilebilir.

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ile elde edilen sonuçların sitolojik analizlerden elde edilen sonuçlarla uyumlaştırılması gerekiyorsa, sitolojik analizlerin en az 200 lökosit ile yapıldığından emin olun.

Pull-up pikleri

Pik yükseklikleri doğrusal algılama aralığının dışındaysa veya yanlış bir matris uygulanmışsa pull-up pikleri oluşabilir. Diğer renk panellerindeki belirli piklerin konumlarında, tipik olarak daha düşük sinyal yoğunluklarıyla görünebilirler. Düzenli gözlem için lütfen matris üretimini tekrarlamayı ve DNA aşırı yüklenmesini kontrol etmeyi düşünün.

Şablondan bağımsız nükleotid ekleme

Terminal transferaz aktivitesi nedeniyle Multi Taq 2 DNA Polymerase, çoğaltılmış DNA parçalarının 3'-ucuna bir adenozin radikali ekleme eğilimindedir. Artefakt piki beklenenden bir baz daha kısadır (-1 bp pik). Tüm BIOTYPE primerleri bu artefaktları en aza indirecek şekilde tasarlanmıştır. Artefakt oluşumu, PCR protokolünün 68 °C'de 60 dakika boyunca son uzatma adımı ile daha da azaltılır. Laboratuvarlar piklerin analizi için kendi bireysel limitlerini tanımlamalıdır.

Artefaktlar

Oda sıcaklığı, PCR ürünlerinin çoklu kapiler cihazlardaki performansını etkileyebilir; ve omuz pikleri veya bölünmüş pikler oluşabilir. Ayrıca, otomatik atama bazı durumlarda etkilenebilir. Bu etkiler ortaya çıkarsa, numuneyi daha yüksek bir oda sıcaklığında tekrar enjekte etmenizi ve belki de çalışma başına birden fazla alel merdiven numunesi kullanmanızı öneririz.

Küçük boya lekeleri gibi artefaktlar da numunelerde ve hatta NTC içinde daha belirgin olarak ortaya çıkabilir. Geniş pik tabanı, anormal pik şekli ve pik ataması olmaması nedeniyle, amplikon piklerinden ayırt etmek mümkündür.

Pipetleme sapmaları

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit sağlamlık analizi, kitin tarif edilen protokolden küçük sapmalara karşı sağlam olduğunu göstermiştir (+/- %10 sapma). Açıklanan deney protokolünden orta düzeyde bir sapma (+/- %20), karışık kimerizmin analizi için daha kritik olabilir (özellikle düşük kimerizm yüzdelerinde). Reaction Mix A PCR Tamponuna özellikle dikkat etmek çok önemlidir. Bu tamponda -%20'lik bir sapma, sinyal yüksekliğinde önemli bir azalmaya ve hatta tespit edilemeyen işaretlere neden olabilir. Sapmaları en aza indirmek için kalibre edilmiş pipetler kullanmanızı, hassas pipetleme yapmanızı ve iyice karıştırmanızı öneririz.

Aykırılar

Aykırı değerleri belirlemek için belirteçler içindeki standart sapmanın (SD_{Marker}) değerlendirilmesi önerilir. Düşük karışık kimerizm örnekleri (< 5% MC) için SD_{Marker} %4'ü ve orta ila yüksek karışık kimerizm örnekleri (> 5% MC) için %10'u aşarsa, lütfen bu belirli aykırı değer olmadan MC değerlerini yeniden analiz etmeyi düşünün.

Polimerlerin etkisi

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, POP-4™ ve POP-7™ polimer üzerinde analiz için doğrulanmış ve onaylanmıştır.

Polimer POP-7™ kullanıldığında, elektroferogramların ön kısmında boya lekeleri oluşabilir. Özellikle, mavi kanalda 110 bp boyutuna kadar boya lekeleri gözlemlenmiştir ve HLD106 lokusunu etkileyebilir. Kimerizm analizini gerçekleştirmeden önce elektroferogramları bu tür etkiler açısından kontrol edin.

Diğer polimerlerin (örn. POP-6™) kullanımı belirli PCR ürünlerinin çalışma davranışını etkileyebilir. Ayrıca, serbest floresan boyaların farklı davranışları nedeniyle arka plan gürültüsü artabilir.

Performans Değerlendirmesi

Analitik özgüllük

GeneMapper™ ID-X yazılımını kullanarak alel merdiveni ile otomatik alel aramayı ve test DNA'larının diğer yöntemlerle (diğer PCR kitleri) önceden tiplendirilmesine kıyasla alel atamasının uyumluluğunu test ettik.

Mentype® DIPscreen PCR Amplifikasyon Kiti kullanılarak analiz edilen seksen bir önceden karakterize edilmiş DNA örneğini değerlendirdik. Pik yükseklikleri ≥ 200 RFU olan eksiksiz profiller tespit edilmiştir. Teste özgü cihaz ayarlarının belirlenmesinin ardından, tüm DIP sistemleri ve amelogenin markörü için tüm DNA örneklerine doğru genotip atanmıştır. Ek olarak, Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit primer özgüllüğünü değerlendirdik. Spesifik olmayan yanlış primer PCR ürünleri gözlenmemiştir, böylece Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit primer spesifikliği sağlanmıştır.

Girişimler ve çapraz reaksiyonlar

Ölçüm prosedürünün sonuçlarını etkileyebilecek potansiyel girişimler, CLSI kılavuzları EP07 (3. baskı), EP37 (1. baskı) önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit için, endojen ve eksojen interferentler belirlenmiş, kılavuzlarda önerildiği gibi PCR reaksiyonunda beklenen maksimum konsantrasyonları (C_{max}) test edilmiş ve interferans gözlenmesi durumunda, hiçbir interferansın tespit edilemediği konsantrasyonu belirlemek için daha fazla konsantrasyon test edilmiştir.

Sonuçlar, PCR reaksiyonunda $2,57E-03$ % v/v'de test edilen endojen interferant kanın, tek genotip DNA'sının tam profilinin ölçümü üzerinde bir interferans etkisi olduğunu gösterdi. Ayrıca, %2, %5 ve %30 MC'de ölçülen karışık kimerizm örnekleri için tedavi edilmemiş gruptan sapmalar gözlenmiştir. Sonuçlar doğruluk sınırlarının dışındaydı ve bu nedenle PCR reaksiyonu üzerinde girişim gösterdi. Bununla birlikte, kan kontaminasyonu PCR reaksiyonunda veya izole edilmiş DNA süspansiyonunda turuncu bir renk kayması ile görsel olarak tespit edilebilir. Eğitimli laboratuvar profesyonelleri renk değişikliği olup olmadığını gözlemlemeli ve herhangi bir girişimi önlemek için DNA izolasyonunu tekrarlamalıdır.

Ekzojen interferentler için EDTA, Sodyum Sitrat, Etanol, Asetilsalisilik Asit, Metoklopramid ve Siklosporin, tek genotip DNA XY1726'nın tam profilinin ölçümünün elde edilebildiği ilgili C_{max} değerlerinde hiçbir interferant etki göstermemiştir ve %2, %5 ve %30 MC' de ölçülen karışık kimerizm numuneleri için gözlenen işlem görmemiş gruptan sapmalar doğruluk sınırları dahilindedir.

Eksojen interferentler Heparin, Proteinaz K ve Metotreksat için ise CLSI EP37^(1. baskı) tarafından önerilen C_{max} değerinde interferans gözlenmiştir. Hiçbir girişim tespit edilemeyene kadar daha fazla seyreltme test edilmiştir. Heparin için $2,36E-02$ mg/dL, Proteinase K için $3,22E-06$ % v/v ve Metotreksat için 13,6 mg/dL herhangi bir girişim göstermedi.

Kan antikoagülanları EDTA, sodyum sitrat ve Heparin ayrıca önerilen izolasyon kitleri ile test edilmiştir. Analitik performans üzerinde herhangi bir etki tespit edilmemiştir. İzolasyon kitlerinin iş akışının, antikoagülanlardan ve DNA izolasyon reaktiflerinden kaynaklanan test edilmiş enterferans maddelerini ortadan kaldırmasını bekliyoruz. Kemoterapi ilacı Metotreksat

ise, referans blankıyla karşılaştırıldığında test edilen konsantrasyonda herhangi bir etkileşim göstermedi.

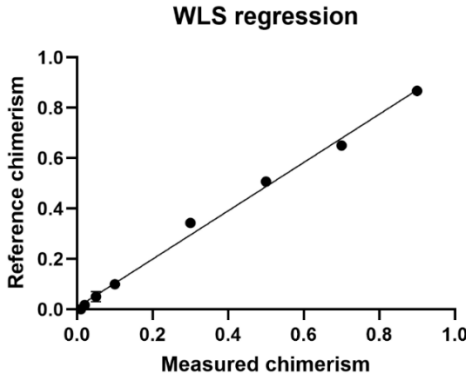
Tablo 14 endojen ve eksojen girişimcilerin test edilen konsantrasyonları.

Müdahalenin türü	Kategori	Müdahale	Karışmayan konsantrasyon
Endojen	Tam kan bileşenleri	Tam kan	Test edilmedi
Dışsal	Antikoagülanlar	EDTA	0.099 mg/dL
		Sodyum, Sitrat	8.pCR'da 23E- 05 % v/v
		Heparin	2.36E- 02 mg/dL
	DNA izolasyon ajanları	Proteinaz K	PCR reaksiyonunda 3,22E-%06 v/v
		Etanol	PCR Reaksiyonunda 2,70E-%03 v/v
	Analjezikler ve antipiretikler	Aspirin (asetilsalisilik asit)	3 mg/dL
	Antiemetik ajan	Metoklopramid	0.225 mg/dL
	Kemoterapötik ajan	Metotreksat	13.6 mg/dL
	İmmünosupresan ajan	Siklosporin	0.18 mg/dL

Analitik hassasiyet

Tek genotipli insan gDNA 'sı 0,125 ng ila 2,00 ng aralığında ölçülebilir. Bu aralıkta, tüm DIP belirteçlerinin ve amelogenin'in tam profilleri hatasız olarak ölçülebilir. Malzeme tüketimini azaltırken kabul edilebilir tam profil analizi için tek genotip DNA'nın optimum giriş miktarı olarak 1.00 ng öneriyoruz. Optimum hassasiyetle karışık kimerizm tespiti için farklı girdi miktarlarını test ettik. Düşük girdi miktarları için kısıtlı hassasiyetten kaçınmak amacıyla, karışık kimerizm tespiti için optimum girdi miktarı olarak 2,00 ng DNA tanımladık.

Doğrusallık, CLSI - EP06Ed2 kılavuzuna (2. baskı) göre değerlendirildi. Doğrusallık altı farklı karışık kimerizm örneği kullanılarak test edilmiştir. Her bir karışık kimerizm örneği, alıcı kimerizmini %1 ila %90 (%1, %2, %5, %10, %30, %50, %70, %90) arasında kapsayacak şekilde seyreltilmiştir. Doğrusallıktan kabul edilebilir sapma (ADL), bu aralıkta yalnızca küçük sapmalara izin vermek için %10 alıcı kimerizmine kadar olan numuneler için %4 olarak tanımlanmıştır. Alıcı kimerizmi > %10 için, doğrusallıktan orta düzeyde sapmalara izin vermek amacıyla ADL %10 olarak ayarlandı. Beklenen ve öngörülen değerler tüm numuneler için ADL 'nin altında olup test edilen kimerizm ölçüm aralığı için doğrusallığı teyit etmektedir.



Şekil 2 82+1180 kimerizm karışımı için farklı kimerizm konsantrasyonlarının ağırlıklı regresyona örnek. Regresyon, %1 ila %90 alıcı kimerizmi test aralığının tamamında ölçülen ve beklenen değerler arasında yüksek derecede doğrusallığı doğrulayan 0,994'lük bir belirleme katsayısı göstermiştir.

Limit of Blank (LoB), iki farklı kit lotu ile üç farklı günde 31 tek genotip DNA üzerinde test edilmiştir. Karışık kimerizm için LoB, CLSI - EP17-A2 'nin parametrik olmayan yaklaşımı kullanılarak hesaplanmıştır ($\alpha = 0,05$; 2. baskı). Yalnızca bilgilendirici belirteçler analiz edilmiştir. Sonuç, %0,49'luk bir LOB'yi doğrulamıştır.

2,00 ng DNA giriş miktarı kullanarak, %0,50 ila %3,00 konsantrasyonlarda üç farklı karışık kimerizm örneğini test ettik. Tüm numuneler iki farklı kit lotu ile test edilmiştir. %95 güven düzeyiyle Probit-Analizi (CLSI - EP17-A2, 2. baskı) kullanarak Lot 1 için Tespit Sınırı (LoD) %1,36 ve Lot 3 için %1,39 olarak bulundu. Elde edilen raporlanabilir LoD %1,39 karışık kimerizmdir.

Tablo 15 LoD için Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit bilgilendirici işletleyiciler kullanarak

Lot	LoD (% karışık kimerizm)	N _{total}
Lot 1	1,36 %	252
Lot 3	1,39 %	252

Miktar belirleme sınırı için hassasiyet hedefi CLSI - EP17-A2 'ye (2. baskı) göre tanımlanmıştır. LoD'de kimerizmin tespiti için Westgard modelini ($TE = I_{bias} + 1,96 s$; (Westgard et al. 1974 [3])) ve tahlilin yanlılığını ve kesinliğini kullanarak hassasiyet hedefini tanımladık. Elde edilen %0,45'lik havuzlanmış standart sapma, TE tabanlı hassasiyet hedefi olan %1,77'nin altında olup LoD'de kabul edilebilir bir doğruluğu teyit etmektedir.

Doğruluk

Kesinsizlik ve yanlılık, farklı kimerizm içerikleri arasında değişiklik gösterebilir. Her aralık için uyarlanmış kabul kriterlerini belirlemek amacıyla, karışık kimerizm (MC) aralığını Pettersson et al. (2021) [4] tarafından da bildirilen üç aralığa bölmeye karar verdik. Aralıklar şunlardır:

- İkinci genotip içeriği < %5 olan düşük MC
- İkinci genotip içeriği %5 - 20 olan orta MC
- İkinci genotip içeriği > %20 olan yüksek MC

Doğruluk analizi CLSI - EP21Ed2Ekılavuzuna (2. baskı) dayanmaktadır. Referans materyalle karşılaştırıldığında ölçülen sapma ve çok sahalı bir çalışmada ölçülen kesinsizlik (tekrar üretilebilirlik), Sigma metriğine dayalı bir sigma değerini hesaplamak için kullanılmıştır (Westgard et al. 2018 [3]). Kabul edilebilir Total Error, doğrusallık çalışmasının yanlılık tahminlerine ve kimerizm analizi için STR tabanlı PCR testleri için bildirilen kesinliğe dayanarak oluşturulmuştur (Pettersson et al.) [4]). Elde edilen sigma değerleri düşük ve orta MC aralığı için iyi doğruluk ve yüksek MC aralığı için mükemmel doğruluk göstermiştir.

Tablo 16 Sigma-karışık kimerizm için değerler

Örnek	Sigma değeri
2 % karışık kimerizm	3,08
5 % karışık kimerizm	3,05
30 % karışık kimerizm	4,99

Doğruluk

Yanlılık değerlendirmesi, üç farklı halka deneyi sağlayıcısından (3 farklı External Quality Control programı) alınan referans materyale dayandırılmıştır. Yanlılık, Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit sonucu ile referans değeri arasındaki fark için hesaplanmıştır:

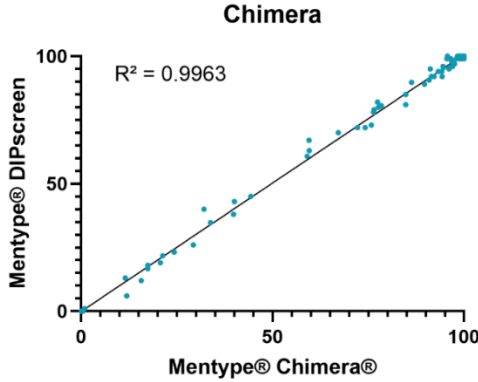
$$\Delta MC = \text{Referans MC} - \text{Mentype DIPscreen MC}$$

Yanlılık hesaplaması CLSI - EP09Ed3cE (3. baskı) kılavuzuna dayanmaktadır ve normal dağılım kanıtlandığı için ΔMC değerlerinin ortalaması kullanılmıştır (Shapiro-Wilk normallik testi, $\alpha = 0.05$). Referans değerlerine göre, örnekler yukarıda açıklandığı gibi (bölüm Doğruluk) MC için üç alt aralığa bölündü. Ortaya çıkan yanlılık -0,68 ile 0,74 arasında değişmektedir.

Tablo 17 Düşük, orta ve yüksek MC için yanlılık (ΔMC ortalaması)

	düşük MC (< 5 %)	orta MC (5 - 20 %)	yüksek MC (> 20 %)
Yanlılık (average of ΔMC)	0,54	0,74	-0,68

Yanlılık değerlendirmesinin yanı sıra Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit bir referans yöntemle karşılaştırdık. PCR tabanlı referans yöntem Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit iki birey (genotip) arasında ayırım yapmak için kısa tandem tekrarları (STR) polimorfizmini analiz eder. Her iki yöntem de farklı karışık kimerizm içeriğini temsil eden 97 hasta örneği ile ölçülmüştür. Elde edilen 0,9963 belirleme katsayısı iki yöntem arasında yüksek bir korelasyon olduğunu doğrulamıştır.



Şekil 3 Referans Yöntem karşılaştırması Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ve Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit. Sağdaki doğrusal regresyon, 0,9963 belirleme katsayısı ile kabul edilebilir bir korelasyon göstermektedir.

Hassasiyet

Testin tekrarlanabilirliği ve yeniden üretilebilirliği ISO 5725-2:2022-05 ve CLSI - EP05 (3. baskı) temelinde değerlendirilmiştir. Kimerizm ölçüm aralığını (%2, %5, %30, %70) kapsayan karışık kimerizm örnekleri 5 x 5 x 3 (gün x replikat x saha) çoklu saha çalışmasında değerlendirilmiştir. Karışık kimerizm için elde edilen tekrarlanabilirlik, karışık kimerizmin %0,60 ila %1,68 standart sapması (SD) arasında ve tekrar üretilebilirlik, karışık kimerizmin %0,63 ila %1,75 SD 'si arasında değişmektedir.

Tahlil Kesimi

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit için test sınırını, farklı amplifiye edilmiş markörlerin alel frekansının hesaplanmasına dayanarak değerlendirdik. 81 kişiden alınan numuneler Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kite analiz edilmiştir. Elde edilen alelik frekanslar, polimorfizm bilgi içeriği (PIC), beklenen heterozigotluk (HET) ve bir genetik markörün veya markör setinin bir popülasyondaki farklı bireyleri ayırt etme yeteneğini gösteren ayırt etme gücü (PD) gibi kimerizm analiziyle de ilgili belirli adli ayrımcılık parametrelerini hesaplamak için kullanılmıştır. PIC ve HET değerleri, Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kiti için yüksek polimorfik

INDEL'lerive yüksek heterozigotluk oranını göstermektedir. Tüm DIP belirteçleri için PD 0,5146 ile 0,6581 arasında değişmektedir, bu da teknik olarak en az bir belirteç temelinde iki bireyin ayırt edilmesine izin vermektedir, ancak daha fazla belirteç birlikte kullanıldığında PD artmaktadır.

Tablo 18 yer alan tüm belirteçlerin ayırım olasılığı Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. PIC, PD ve HET her bir markör için 81 bireyin analizine dayalı olarak hesaplanmıştır.

İşaretleyici	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

İşaretleyici	PIC	HET	PD
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

Kullanım sırasında stabilite

Tüm stabilite çalışmaları ISO 23640:2015 ve CLSI EP25 kılavuzuna (2 Baskı) uygun olarak planlanmıştır. Tüm stabilite çalışmaları için aşağıdaki prosedür uygulanmıştır: Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, çeşitli süreler boyunca birden fazla zaman noktasında test edilmiştir. Kimerizm örneklerinin analizi ChimerisMonitor IVD kullanılarak gerçekleştirilmiş, XY1726 ve XX1180'in tek genotip DNA'sı sırasıyla alıcıyı ve donörü temsil etmiştir.

Tek genotip DNA XY1726'yı 1 ng DNA giriş miktarında ve XY1726:XX1180 (alıcı:donör) karışık kimerizm örneklerini (MC) %4 ve %30 MC'lik farklı MC aralıklarını temsil eden 1 ng DNA giriş miktarında analiz ettik. Ana karışım kararlılığı için, %30 ve %5 MC için 1 ng DNA girişi ve %2 MC için 2 ng DNA girişi ile %30, %5 ve %2 MC'lik farklı MC aralıklarını test ettik.

Çeşitli koşulların nihai değerlendirmesi, başlangıç zaman noktası (t_0) ile farklı zaman noktalarının (t_n) ortalamaları arasındaki karşılaştırmayı içeriyordu ve aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı:

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

Kullanım İçi Stabilite çalışması için üç deney gerçekleştirilmiştir. Biri donma ve çözülme döngülerine maruz kaldıktan sonra stabiliteyi test etmek için, biri ana karışımın farklı kullanımından sonra stabiliteyi test etmek için ve diğeri de açıldıktan sonra simüle edilmiş kullanım sırasında kitlerin stabilitesini test etmek için.

Ana karışım stabilite deneyinde test edilen tüm numuneler , tek genotipli DNA XY1726 için tam bir markör profili sunmuş ve test edilen üç MC numunesi için tahlilin toplam hataya dayalı doğruluk ve kesinlik sınırlarının altında kalmıştır: %30, %5 ve %2 MC limitleri sırasıyla %3,31, %3,62 ve %1,77'dir. Bu nedenle, Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ana karışımın farklı bir şekilde kullanılmasından etkilenmez.

For the freeze and thaw stability, the Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit To'dan kritik kabul edilemez sapmalar göstermedi ve tek genotip DNA XY1726 için tam bir belirteç profili gösterdi ve test edilen MC örnekleri için deneyin toplam hata tabanlı doğruluk sınırlarının altındaydı: %30 ve %4 ile sınırları %3,31 ve %2,85'tir. Bu nedenle Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit 20 dondurma ve çözme döngüsüne kadar stabildir.

Açıldıktan sonra simüle edilen kullanım sonuçlarına göre, Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ilk açılışından sonra 12 aya kadar kullanım için stabildir ve 20 dondurma ve çözme döngüsüne kadar stabildir.

Klinik performans verileri

Çalışma tasarımı, etik ve düzenleyici hususlar

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ve referans yöntemler allo-HSCT sonrası hasta örnekleri üzerinde test edilmiştir. Bu çalışmaya dahil edilen 10 hasta allo-HSCT sonrasında izlenmiş ve izleme sırasında alınan örneklerin donör içeriği allo-HSCT sonrasında 10 kez analiz edilmiştir. Bu çalışmanın amacı, 7 Ağustos 2002 tarihli tıbbi cihaz yasası'Medizinproduktgesetz 'in (MPG versiyonu) §§ 20 ila 24'üne göre klinik kanıt sağlamaktır (BGBl. I S 3146). Sitogenetik referans yöntemi FISH kullanılarak, cihazın delesyon ekleme polimorfizmine dayalı PCR yöntemiyle bir uyumun kanıtlanması gerekiyordu. Sorumlu etik komisyonunun onayı 14.03.2012 tarihinde alınmıştır.

Referans yöntemleri

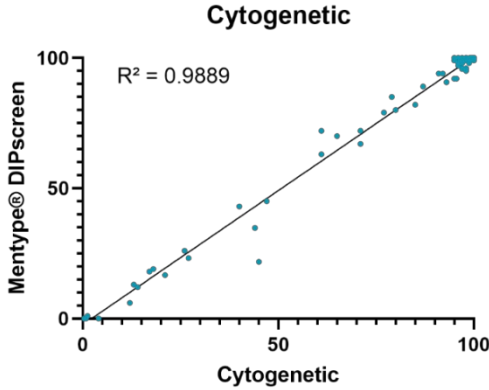
Referans yöntem olarak, Fluorescence-In-Situ-Hybridization (FISH) was conducted using allosome-specific CE-IVD CEP® X SpectrumOrange™ / Y SpectrumGreen™ Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden). Referans yöntemini uygulamak için, sadece farklı cinsiyetteki alıcı-verici çiftleri çalışmaya dahil edilmiştir. Üreticilerin önerileri doğrultusunda yalnızca hücre sayısı > 200 olan sitogenetik sonuçlar değerlendirildi.

DNA extraction and purification

DNA, QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE) kullanılarak izole edilmiştir. İzolasyon, üretici protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlar

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ile sitogenetik referans yöntemi arasındaki $R^2 = 0,9889$ ile yüksek korelasyon, allo-HSCT sonrası kimerizm takibi için uygulanabilirliği doğrulamaktadır.



Şekil 4 Sitogenetik ve Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit sonuçlar grafikte gösterilmiştir. Doğrusal regresyon, 0,9889 (N = 87) belirleme katsayısı ile kabul edilebilir bir korelasyon ortaya koymaktadır

Referans yöntem sonuçlarıyla elde edilen %94,25'lik uyum (%5 Δ MC kabul edilmiştir), Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit klinik veri yorumlaması için güvenilirliğini doğrulamaktadır.

Tanısal Değerlendirme

Klinik performans özellikleri kabul edilebilir sonuçlar göstermiştir. Sonuçlar,%1'lik birPCR ve sitogenetikLoD'a göre değerlendirilmiştir (Bader et al. 2023 [5]). IVDR Ek I, Bölüm 9.1b'ye göre klinik performans değerlendirmesine yönelik parametrelerin IVDR were found to be not completely applicable for the Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Cihaz, bir analitin varlığından ziyade bir analit aralığını izler. Bu nedenle, analitin negatif ve pozitif durumunun değerlendirilmesi tamamen uygulanabilir değildir.

Tablo 19 Tanısal özellikler

Tanısal özellikler	Tahmin	Alt Güven Aralığı	Üst Güven Aralığı
Tanısal Hassasiyet	96,0 %	90,6 %	100,0 %
Teşhis Özgüllüğü	76,3 %	62,8 %	89,8 %
Teşhis Doğruluğu	87,5 %	80,6 %	94,4 %
Pozitif prediktif değer	84,2 %	74,7 %	93,7 %
Negatif prediktif değer	93,5 %	84,9 %	100,0 %
Yaygınlık	56,8 %	46,5 %	67,2 %

Kalite Kontrol

Tüm kit bileşenleri BIOTYPE GmbH'de yoğun bir kalite güvence sürecinden geçmektedir. Test kitinin kalitesi, sınırsız kullanılabilirliği sağlamak için sürekli olarak izlenir. Kalite güvencesi ile ilgili herhangi bir sorunuz varsa lütfen bizimle iletişime geçin.

Teknik Destek

Teknik tavsiye için lütfen Customer Support Ekibimizle iletişime geçin:

e-posta: support@biotype.de

telefon: +49 (0)351 8838 400

Referanslar

[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. Status March 2023 www.onkopedia.com.

Kullanım Sınırlamaları

- Bu IFU'da belirtilen prosedürler açıklandığı şekilde takip edilmelidir. Herhangi bir sapma tahlil başarısızlığıyla sonuçlanabilir veya hatalı sonuçlara neden olabilir.
- Bu ürünün kullanımı, PCR teknikleri ve kapiler jel elektroforezi konusunda özel olarak bilgilendirilmiş ve eğitilmiş profesyonel laboratuvar kullanıcılarıyla sınırlıdır.
- Bu testin optimum performansı için uygun numune toplama, taşıma, saklama ve işleme prosedürleri gereklidir.
- Kit, yalnızca listelenen PCR cihazları kullanılarak insan periferik venöz tam kan örnekleriyle kullanım için doğrulanmıştır. Bkz. Bölüm Cihazlar ve yazılım
- Bu testdoğrudan numune üzerinde kullanılmamalıdır. Bu test kullanılmadan önce uygun nükleik asit ekstraksiyon yöntemleri uygulanmalıdır.
- DNA örneklerinin kanla kontamine olması ürünün performansını olumsuz etkiler. DNA ekstraksiyonu sırasında kontaminasyon oluşmadığından emin olun ve gerekirse ekstraksiyonu tekrarlayın.
- Kit yalnızca DNA ekstraksiyonu ve saflaştırması için Reaktifler, kitler ve sarf malzemeleri bölümünde açıklanan kitler kullanılarak doğrulanmıştır.
- Kitin performansını sağlamak için iyi laboratuvar uygulamaları gereklidir.
- Sonuçlar, kimerizm analizlerinin sonuçlarını diğer tedavi veya tanı ile ilgili yöntemlerin sonuçlarıyla birleştiren klinisyenlere danışılarak yorumlanmalıdır.
- Sonuçların yorumlanmasında yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuç olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır.
- Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, donör ve alıcının tek yumurta ikizi olması durumunda kullanılamaz.

- Çift transplantasyonlar performans değerlendirmesinin bir parçası olarak doğrulanmamıştır.
- Bozulmuş DNA içeren numuneler INDEL/DIP ve cinsiyete özgü lokusları tespit etme kabiliyetini etkileyebilir
- Süresi dolmuş parçaları yanlış depolanmış parçalarda kullanmayın.
- Kimerizm analizi hastaya özgü bilgilendirici belirteçler kullanılarak doğrulanmıştır (tüm kimerizm aralıkları için).
- Farklı etnik gruplardan alınan numuneler, farklı alel frekansları gibi farklı genetik özellikler sergileyebilir ve bu da ayrımcılık veya amplifikasyon gücünü sınırlayabilir. Bazı DIP markörlerinin birden fazla popülasyondaki allelik frekansı değerlendirilmiştir. Birleştirilmiş ayırım gücü 0,99'u aşan değerlerle yüksektir. Bu, bir hastanın testinin amplifikasyon zorluklarıyla karşılaşma riskinin nispeten düşük olduğunu göstermektedir. Ancak, şu anda Kafkasya için nüfus verileri mevcuttur. Diğer etnik gruplar için potansiyel etki henüz tahmin edilememektedir.

Sipariş bilgileri

Siparişlerinizi e-posta yoluyla şu adrese yönlendirin sales@biotype.de.

Ürün	Ambalaj boyutu	Sipariş numarası
Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit	25 reaksiyon 100 reaksiyon	45-12300-0025 45-12300-0100
Matrix Standard BT5 multi	1 x 25 µL 2 x 25 µL	45-15100-0025 45-15100-0050
ChimerisMonitor IVD	demo lisansı 1 yıllık lisans 3 yıllık lisans	46-14800-0000

NOT



Kitlerin münferit bileşenleri ayrı olarak sipariş edilemez.

Ticari Markalar ve Feragatnameler

Mentype® ve Chimera® BIOTYPE GmbH'nin tescilli ticari markalarıdır.

Diğer ticari markalar: ABI PRISM®, GeneMapper®, GeneAmp® ve Applied Biosystems® (Applied Biosystems LLC grubu); QIAamp® (Qiagen); POP-4™ (Avrupa: Applied Biosystems LLC, ABD: Life Technologies Corporation).

PCR patent kapsamındadır. Patent sahipleri Hoffmann-La Roche Inc. ve F. Hoffmann-La Roche'tur (Roche).

Bu belgede kullanılan tescilli isimler, ticari markalar, vb. özellikle bu şekilde işaretlenmemiş olsalar bile, yasalarca korunmasız olarak kabul edilmemelidir.

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit , Avrupa in vitro tanı yönetmeliği (AB) 2017/746'ya göre CE işaretli bir tanı kitidir.

Ürün Health Canada tarafından ruhsatlandırılmamıştır ve FDA tarafından onaylanmamıştır.

Tıbbi cihaz tüm ülkelerde mevcut değildir.

© 2025 BIOTYPE GmbH; tüm hakları saklıdır.

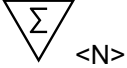
Sembollerin Açıklanması



Üretici firma



Toplu kod



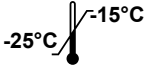
<> N test için yeterli reaktif içerir



Elektronik kullanım talimatlarına (eIFU) başvurun



Son kullanım tarihi



Sıcaklık limiti



Katalog numarası



İn vitro diagnostik tıbbi cihaz



Güneş ışığından uzak tutun



Kuru tutun



Benzersiz cihaz tanımlayıcısı

Bu Kullanım Talimatında kullanılan diğer işaretler:



Yararlı ipuçları



Dikkat, bu uyarıyı takip ettiğinizden emin olun!

mavi altı çizili metin

Ana sayfalar, e-posta adresleri gibi harici içeriklere yönlendiren bağlantılar

siyah altı çizili metin

Kolay gezinme için belge içinde çapraz bağlantılar

girintili, el yazısı, kalın metin

Bir yazılımda tıklanacak alanlar

Ekler

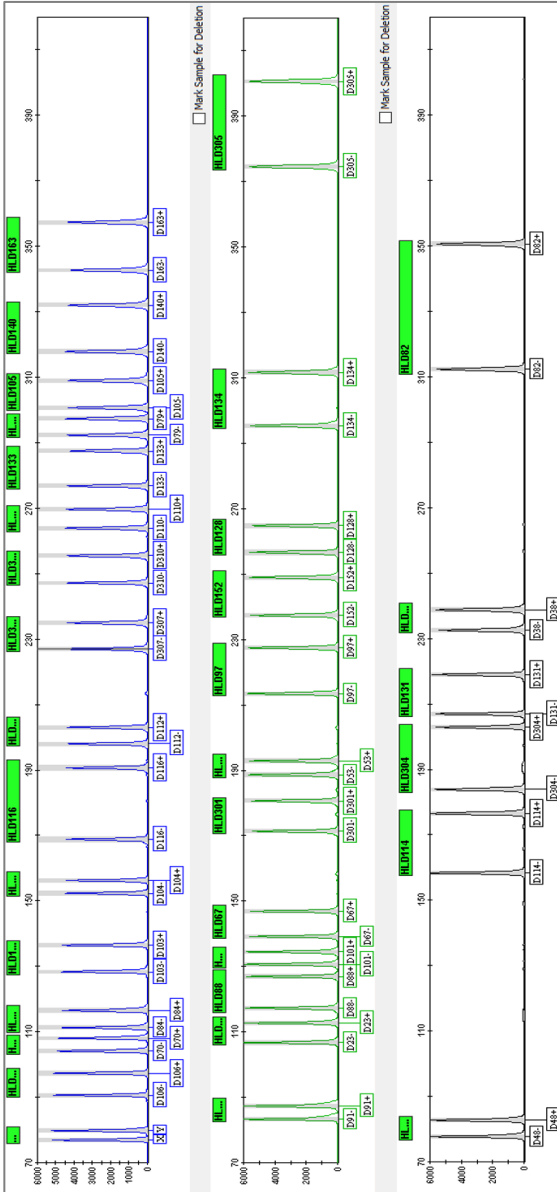
Referans örneklerin elektroferogramları

İlerleyen sayfalarda Mentype® DIPscreen Allelic Ladder (Şekil 5), Control DNA XY82 (PC, Şekil 6) ve şablonsuz kontrol (NTC, Şekil 7) elektroferogram örneklerini bulabilirsiniz.

Tüm örnekler bir ProFlex PCR döngü cihazında çoğaltıldı ve doğrulanmış çalışma parametresi kullanılarak bir Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer (POP-4™, 36 cm array) üzerinde analiz edildi. Veri analizi GeneMapper ID-X sürüm 1.6 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tablo 12'ye göre Bins, Panels şablonları ve Analysis Method uygulanmıştır.

Elektroferogramlar 70 - 420 bp parça uzunluğuna yakınlştırılmıştır (x ekseni). Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit kullanılarak parça uzunluğu analizi (x ekseni) için genel aralık 50 bp ila 550 bp'dir. Y ekseninin ölçeklendirilmesi her bir şeklin altındaki açıklamaya göre ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir (Şekil 5, Şekil 6, Şekil 7).

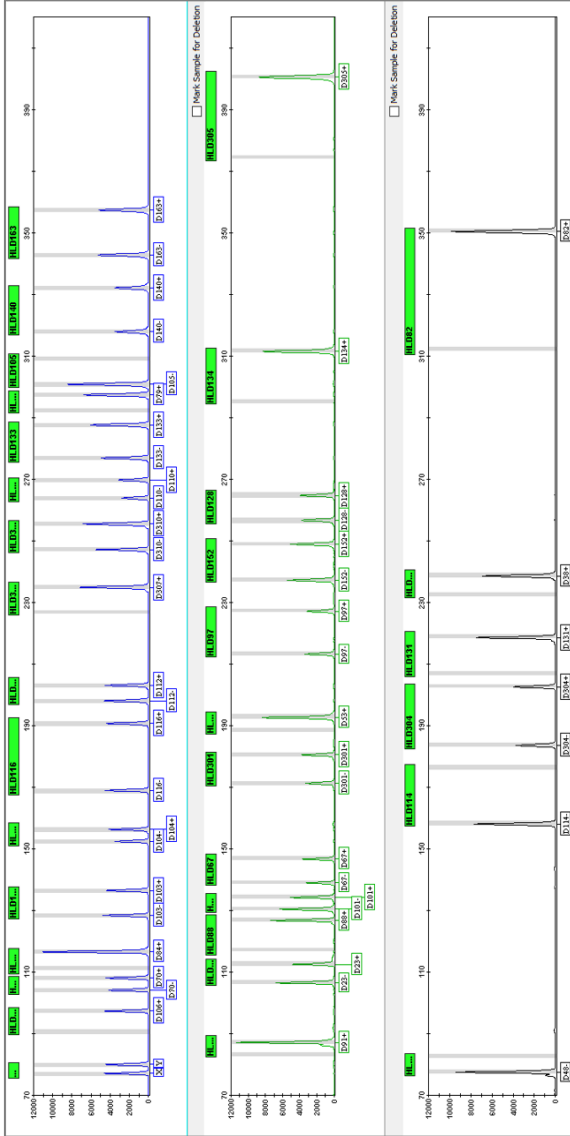
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder



Şekil 5 Mentype® DIPscreen Allelic Ladder

6.000 RFU'ya (y eksen) ve 70 - 420 bp'ye (x eksen) yakınlaştırma

Control DNA XY82 (PC)



Şekil 6 Control DNA XY82 (PC)

12.000 RFU'ya (y eksen) ve 70 - 420 bp'ye (x eksen) yakınlaştırma

Şablon kontrolü yok (NTC)



Şekil 7 Şablon Kontrolü Yok (NTC)

1.000 RFU'ya (y eksen) ve 70 - 420 bp'ye (x eksen) yakınlaştırma

Parçaların ve alellerin uzunlukları

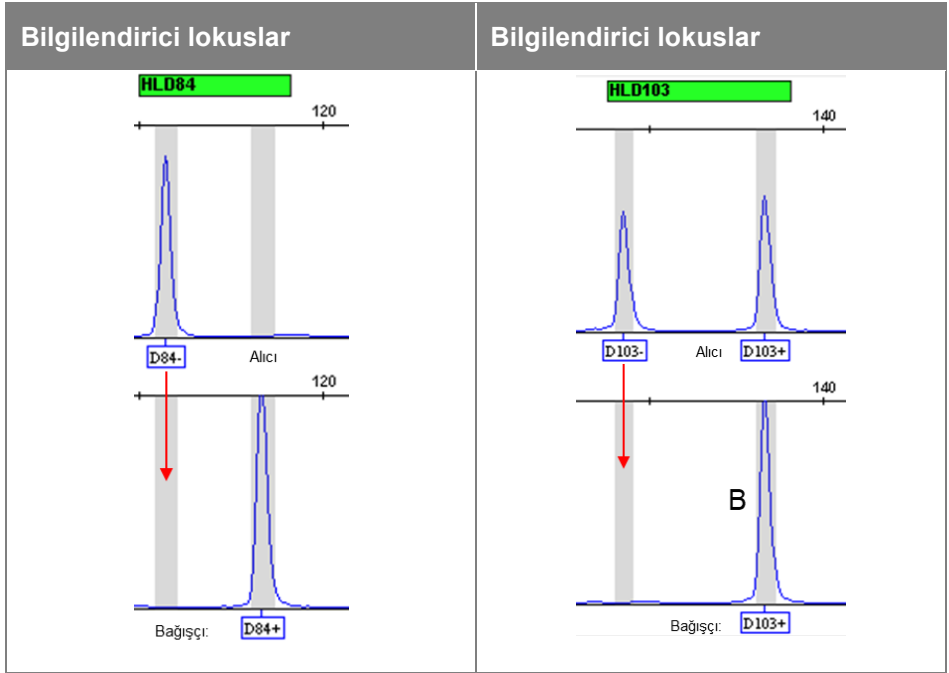
Tablo 20 shows the fragment lengths of individual alleles that refer to the DNA Size Standard 550 (BTO). Tüm analizler POP-4™ polimer ile ABI PRISM® 310/3130 Genetic Analyzer gerçekleştirilmiştir. Farklı analiz cihazları, DNA boyut standartları veya polimerler farklı parça uzunluklarına neden olabilir. Ek olarak, alel merdiveni ile görsel bir hizalama yapılması önerilir.

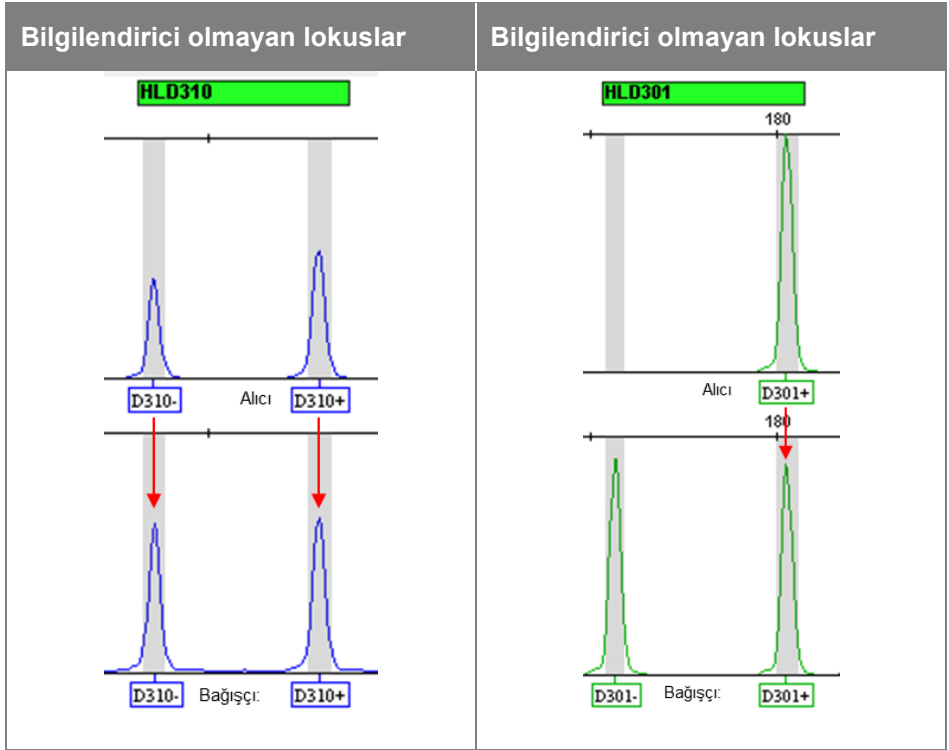
Tablo 20 Parça uzunlukları Mentype® DIPscreen Allelic Ladder üzerinde analiz edilmiştir ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer ile POP-4™ polimer,
* tam sayıya yuvarlanmış

İşaretleyici/ Mavi kanal	Boyut -DIP [bp]*	Boyut +DIP [bp]*	İşaretleyic i/ Yeşil kanal	Boyut -DIP [bp]*	Boyut +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	İşaretleyic i/ Sarı kanal	Boyut -DIP [bp]*	Boyut +DIP [bp]*
HLD105	302	310			
HLD140	318	333			
HLD163	344	358			
			HLD48	78	83
			HLD114	159	177
			HLD304	184	203
			HLD131	208	220
			HLD38	234	240
			HLD82	314	352

Lokusların nitel değerlendirmesine yönelik örnekler

Tablo 21 Bilgilendirici lokusların nitel değerlendirmesi için örnekler



Tablo 22 Bilgilendirici olmayan lokusların nitel değerlendirmesi için örnek

BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Tel: +49 351 8838 400

Fax: +49 351 8838 403

www.biotype.de

Sipariş verme

sales@biotype.de

Müşteri Hizmetleri Desteği

support@biotype.de

