

Mentype[®] DIPscreen

PCR Amplification Kit

Návod na použitie (IFU)



0483

Na diagnostické použitie in vitro

DISIFU02v2sk

05.09.2025



45-12300-0025

45-12300-0100



Kód dávky



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

Webová stránka: www.biotype.de

E-mail: support@biotype.de

Objednávanie: sales@biotype.de



Oznámenie o zmene

Upozorňujeme na nasledujúce úpravy v porovnaní s predchádzajúcou verziou IFU:

Kód dokumentu	Zmeny	Dátum
DISIFU02v1sk	Počiatočná verzia	21.03.2025
DISIFU02v2sk	Doplnenie k riešeniu rušivých vplyvov v kapitole Obmedzenia používania	05.09.2025

Tlačená verzia tohto IFU môže byť poskytnutá bezplatne do 7 dní.

V tejto súvislosti alebo v prípade akýchkoľvek ďalších otázok nás kontaktujte:

na čísle +49 351 8838 400 alebo

support@biotype.de

Obsah

Zamýšľaný účel.....	4
Vedecké pozadie.....	4
Popis produktu.....	5
Poskytnuté materiály.....	7
Obsah súpravy	7
Popis komponentov.....	8
Skladovanie činidiel a manipulácia s nimi	9
Požadovaný, ale nedodaný materiál a zariadenia	9
Všeobecné laboratórne vybavenie.....	9
Reagenty, súpravy a spotrebný materiál	10
Nástroje a softvér	11
Vzorky a skúšobné vzorky	12
Upozornenia a bezpečnostné opatrenia.....	13
Upozornenie pre používateľa	14
Postup.....	15
Prehľad experimentálneho pracovného postupu	15
Príprava vzorky	15
Požiadavky na surovú vzorku.....	15
Extrakcia DNA	16
Kvantifikácia a riedenie DNA.....	16
Ukladanie DNA	17
Príprava kontroly	17
Pozitívna kontrola PC	17
Kontrola bez šablón NTC	18
Nastavenie hlavného mixu	18
Amplifikácia PCR	20
Kapilárna gélová elektroforéza.....	21
Príprava produktov PCR	21

Analýza dĺžky fragmentov	22
Analýza údajov	25
Všeobecný postup analýzy údajov	25
Overenie správnosti spustenia pracovného postupu	26
DNA Size Standard 550 (BTO).....	26
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder	27
Control DNA XY82 (PC)	27
Kontrola bez šablón NTC	28
Analýza vzoriek	29
Analýza údajov o pracovných postupoch	29
Kvalitatívna analýza - identifikácia informatívnych lokusov	30
Semikvantitatívna analýza - analýza chimérizmu	30
Analýza údajov pomocou ChimerisMonitor IVD.....	32
Analýza údajov pomocou GeneMapper™ ID-X	34
Príprava GeneMapper™ ID-X softvéru	34
Riešenie problémov	37
Hodnotenie výkonu	39
Údaje o klinickej výkonnosti	48
Kontrola kvality	51
Technická pomoc	51
Odkazy	51
Obmedzenia používania	52
Informácie o objednávaní	53
Ochranné známky a odmietnutie zodpovednosti	54
Vysvetlenie symbolov	55
Príloha	57

Zamýšľaný účel

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit je manuálny test určený na použitie s genómovou DNA získanou zo vzoriek periférnej žilovej plnej krvi odobratých dospelým pacientom s leukémiou, ktorí podstúpili alogénnu transplantáciu krvotvorných kmeňových buniek (alo-HSCT).

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit detekuje 33 polymorfizmov delécie a inzercie (DIP) a amelogenín v jednej multiplexnej PCR reakcii. Pred HSCT sa tieto polymorfizmy používajú na kvalitatívny skríning genotypov pacienta a darcu a na identifikáciu DIP-alieľ špecifických pre pacienta. Tieto informatívne alely sa analyzujú na semikvantitatívne monitorovanie chimérizmu po alo-HSCT.

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit je určená pre profesionálnych používateľov vyškolených v molekulárno-genetických technikách, multiplexnej PCR a obsluhu Genetic Analyzers od Thermo Fisher Scientific (divízia Applied Biosystems).

Vedecké pozadie

Alogénna transplantácia krvotvorných kmeňových buniek (alo-HSCT) je liečebnou metódou na liečenie pacientov s nemalígnymi a malígnymi hematologickými ochoreniami, ako je leukémia. Analýza chimérizmu sa používa na určenie zmesi hematopoetických buniek darcu a príjemcu u príjemcov alo-HSCT s cieľom odhaliť včasné príznaky odmietnutia transplantátu. Na genotypizáciu a monitorovanie sa používa ľudská periférna žilová krv. Podľa usmernení CLSI (MM05-A2 2. edícia) sa na odber krvi odporúčajú antikoagulanty ako EDTA a citrát. V závislosti od úspešnosti transplantácie sa môžu vyvinúť rôzne formy hematopoetického chimérizmu (kompletný, zmiešaný alebo stratový). Na analýzu chimérizmu sa používajú rôzne prístupy vrátane fluorescenčnej in situ hybridizácie (FISH), polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov (RFLP), analýzy krvného obrazu a metód založených na PCR. Analýza inserčno-delečných polymorfizmov (INDEL alebo DIP) umožňuje semikvantitatívnu analýzu chimérizmu pomocou prístupov multiplexnej PCR, ako aj kvantitatívnu analýzu s aplikáciou špecifickou pre alelu na platformách qPCR alebo dPCR. Preto sú takéto testy DIP predpokladom citlivého monitorovania chimérizmu.

Na odhalenie včasných príznakov odmietnutia štetu by sa mala v pravidelných intervaloch a krátko po alo-HSCT vykonať analýza chimérizmu.

Popis produktu

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit je multiplexná súprava na amplifikáciu polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) vyvinutá na monitorovanie chimérizmu. Na účely diskriminácie darcu a príjemcu sa v jednej PCR reakcii súčasne amplifikujú bialelické polymorfizmy s veľmi vysokou mierou heterozygotnosti a vyváženým rozdelením alel na 19 chromozómoch (pozri Tabuľka 1) Jeden primér pre každý lokus je označený fluoroformom 6-FAM™, BTG alebo BTY. Produkty PCR sa potom analyzujú pomocou kapilárnej gélovej elektroforézy.

Tabuľka 1 Informácie špecifické pre lokus pre Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, HLD = ľudský lokus DIP, -DIP = delecia, +DIP = inzercia

DIP Lokus	Chromozomálna poloha	DIP Lokus
FAM Panel		
AM X	Xp22.1-22.3	
AM Y	Yp11.2	
HLD106	16q13	-/AATGCGT
HLD70	6q16.1	-/AGCA
HLD84	8q24.12	-/CTTTC
HLD103	12q23.1	-/GCTTATAA
HLD104	13q32.1	-/ACTC
HLD116	18p11.22	-/AGGTGTGCAACAACATGATAC
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	-/AACTACGGCACGCCC
BTG Panel		
HLD91	11q14.1	-/GATA
HLD23	18p11.32	-/CTTTAA
HLD88	9q22.33	-/CCACAAAGA
HLD101	15q26.1	-/GTAG
HLD67	5q33.3	-/CTACTGAC
HLD301	17q21.32	-/CAGGGGCTC
HLD53	3q22.1	-/ATGT

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

Test bol validovaný analýzou chimérizmu viac ako 200 príbuzných párov darca - príjemca, ktoré sa zhodujú v HLA, a jeho vhodnosť bola potvrdená v porovnávacej klinickej hodnotiacej štúdii.

Detekčný limit pre kvalitatívnu analýzu je 125 pg genómovej DNA.

Vstupný rozsah pre detekciu zmiešaného chimérizmu za štandardných podmienok je 1,0 - 2,0 ng gDNA. Optimálny vstup gDNA je 2 ng za štandardných podmienok.

Citlivosť 1,4 % LoD₉₅ (limit detekcie) možno dosiahnuť pri použití 2 ng gDNA ako vstupného materiálu na analýzu informatívnych markerov. Na dosiahnutie uvedenej citlivosti sa odporúča použiť čo najviac informačných markerov.

Poskytnuté materiály

Obsah súpravy

Tabuľka 2 Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit obsah

Reagent	Farba uzáveru		Objem na veľkosť balenia	
			25 reakcií	100 reakcií
Nuclease-Free Water	Svetlomodrá		1,5 mL	2 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Fialová		125 µL	500 µL
Mentype® DIPscreen Primer Mix	Červená		125 µL	500 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Biela		15 µL	60 µL
Control DNA XY82 (2 ng/µL)	Biela		10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Oranžová		13 µL	50 µL
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder	Zelená		25 µL	25 µL

Prehľad čísel šarží komponentov nájdete na štítku, ktorý sa nachádza na vnútornej strane chlopne škatule.

POZNÁMKA

Upozorňujeme, že veľkosť balenia opisuje počet testov **bez** zohľadnenia počtu požadovaných kontrol alebo požadovaného prebytku na pipetovanie.

i

Pre zodpovedajúcu priepustnosť odporúčame použiť nasledujúcu veľkosť:

- < 8 vzoriek na jeden cyklus PCR: veľkosť balenia 25 reakcií
- ≥ 8 vzoriek na jeden cyklus PCR: veľkosť balenia 100 reakcií

Popis komponentov

Nuclease-Free Water: Voda triedy PCR, ktorá sa používa v PCR zostave a ako kontrola bez šablóny (NTC).

Reaction Mix A: PCR pufr obsahujúci dNTP a $MgCl_2$. PCR pufr je optimalizovaný tak, aby podporoval aktivitu enzýmov pri PCR.

Mentype® DIPscreen Primer Mix: multiplexná zmes oligonukleotidových primérov obsahujúca značené priméry (značka: 6-FAM™, BTG, BTY) a neznačené priméry.

Multi Taq 2 DNA Polymerase: taq DNA polymeráza s horúcim štartom, 2,5 U/ μ L.

Control DNA XY82 (2 ng/ μ L): genómová DNA izolovaná z krvi EDTA jediného ľudského muža. DNA sa má použiť ako kvalitatívna externá pozitívna kontrola pre Mentype® DIPscreen Amplification Kit.

POZNÁMKA

i

Control DNA XY82 nie je pre laboratórneho pracovníka kritická, pretože pozostáva z jednotlivých molekúl DNA, ktoré boli prečistené, nie sú nebezpečné a nemajú žiadne aktívne biologické funkcie. Neobsahuje žiadne živé bunky ani patogénne organizmy, ktoré by mohli predstavovať priamu hrozbu.

DNA Size Standard 550 (BTO): zmes fluorofórom značených PCR fragmentov s definovanou dĺžkou fragmentu v rozmedzí 60 - 550 bp, zložka sa pridáva ku každému PCR produktu pred analýzou dĺžky fragmentu, používa sa na regresiu veľkosti na presné určenie dĺžky fragmentu PCR produktov.

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder: zmes umelých produktov PCR reprezentujúcich všetky alely zistené testom, ktorá sa používa ako genotypová referencia na presnú identifikáciu alely.

Skladovanie činidiel a manipulácia s nimi

Súprava sa dodáva na suchom ľade. Komponenty súpravy by sa mali dodávať zmrazené, okrem Multi Taq 2 DNA Polymerase, ktorá je uložená v pufrí zabráňujúcom zmrazeniu činidla.

Pri prevzatí súpravy skontrolujte jej úplnosť. Nepoužívajte súpravy, ktoré boli pri príchode rozmrazené. Ak jeden alebo viacero komponentov nie je zmrazených alebo ak boli počas prepravy poškodené trubice alebo obal, nie je možné zaručiť výkon.

Všetky zložky skladujte pri teplote -25 °C až -15 °C, chránené pred svetlom. Predovšetkým Mentype® DIPscreen Primer Mix, DNA Size Standard 550 (BTO) a Mentype® DIPscreen Allelic Ladder sa musia skladovať chránené pred svetlom.

Aby sa zabránilo kontaminácii, odporúčame, aby sa komponenty pred amplifikáciou (vzorky DNA, Control DNA XY82) a komponenty po amplifikácii (DNA Size Standard 550 (BTO) a Mentype® DIPscreen Allelic Ladder) skladovali a používali oddelene od PCR reagentov (Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A a Mentype® DIPscreen Primer Mix).

Platnosť súpravy uplynie podľa informácií na štítku na škatuli súpravy alebo 12 mesiacov po otvorení, podľa toho, čo nastane skôr. Neprekračujte maximálne 20 zmrazovacích a rozmrazovacích cyklov.

Požadovaný, ale nedodaný materiál a zariadenia

Všeobecné laboratórne vybavenie

- Stolná centrifúga s rotorom pre 2 mL a 200 µL reakčné skúmavky
- Odstredivka s rotorom pre mikrotitračné platne pre 96 jamkové reakčné platne
- Vírový mixér
- Kalibrované nastaviteľné pipety so jednorazovými špičkami filtrov s tesným aerosólom

- Vhodné 200 µL 96-jamkové reakčné platne alebo 200 µL reakčné skúmavky s príslušným uzatváracím materiálom, PCR trieda
- Vhodné stojany pre 2 mL a 200 µL reakčné skúmavky
- Chladiaci stojan vhodný pre 2 mL skúmavky
- Jednorazové rukavice bez prášku
- NanoDrop™ One Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) alebo Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific)

POZNÁMKA

Všetky materiály použité na PCR by mali mať primeranú kvalitu (bez DNA a pre molekulárnu biológiu). Uistite sa, že všetky použité prístroje boli nainštalované, kalibrované, skontrolované a udržiavané podľa pokynov a odporúčaní výrobcu.

Reagenty, súpravy a spotrebný materiál

Tabuľka 3 Potrebné, ale nedodané reagenty

Reagent	Dodávateľ	Číslo objednávky
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

Reagent	Dodávateľ	Číslo objednávky
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

Nástroje a softvér

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit bola validovaná na použitie s nasledujúcimi PCR cyklérmi:

- ProFlex PCR System (kat. č.: 4484073 (3 x 32-jamkový blok na vzorky), 4484075 (96-jamkový blok na vzorky), Thermo Fisher Scientific)
- GeneAmp® PCR System 9700 Silver (ukončené, kat. č. N805-0200, Thermo Fisher Scientific)
- Mastercycler nexus gradient (kat. č.: 6331000017, Eppendorf AG)
- Biometra Tadvanced (kat. č: 846-2-070-214, Analytik Jena)

Na vykonanie testu je potrebný len jeden z uvedených prístrojov.

Použitie iných nástrojov, ako sú uvedené, musí overiť používateľ. Musia byť splnené tieto požiadavky:

- Vyhrievané veko
- Blok vhodný pre 200 µL reakčné platne/skúmavky
- Rampovanie nastaviteľné na 4 - 5 °C/s

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit bola validovaná na použitie s nasledujúcimi prístrojmi a nastaveniami:

- Applied Biosystems 3500 Genetic Analyser (Thermo Fisher Scientific), verzia softvéru 4.0.1
 - POP-4™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers
 - POP-7™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers
 - 3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 36 cm
 - 3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 50 cm

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit bola validovaná na použitie s nasledujúcim softvérom. Na analýzu a vyhodnotenie údajov je potrebný len

jeden z nižšie uvedených softvérov. Manuálne vyhodnotenie súborov fsa alebo akýchkoľvek výsledkov poskytnutých pomocou softvéru na zber údajov bez jednej z dvoch opísaných možností softvéru na analýzu a vyhodnotenie údajov sa neoveruje.

- ChimerisMonitor IVD, verzia 3.0.x (BIOTYPE GmbH)
- Softvér GeneMapper™ ID-X, verzia 1.6 (Thermo Fisher Scientific), s použitím špecifického produktu:
 - AnalysisMethod: DIPscreenIVD_Analysis4_v1x alebo DIPscreenIVD_Analysis7_v1x
 - Bin: DIPscreenIVD_Bins4_v1x alebo DIPscreenIVD_Bins7_v1x
 - Panel: DIPscreenIVD_Panel4_v1x alebo DIPscreenIVD_Panel7_v1x
 - Size Standard: BTO_60-550_v1x

POZNÁMKA



Uistite sa, že všetky použité prístroje boli nainštalované, kalibrované, skontrolované a udržiavané podľa pokynov a odporúčaní výrobcu.

Vzorky a skúšobné vzorky

Nasledujúce vzorky boli validované pomocou súpravy Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit:

- Genomická DNA izolovaná z ľudskej periférnej venóznej plnej krvi (EDTA, citrát, heparín) na monitorovanie a genotypizáciu.

Izolovaná gDNA by sa mala skladovať nezriedená pri teplote -25 °C až -15 °C.

POZNÁMKA



Uistite sa, že antikoagulant použitý na odber krvi je kompatibilný s pokynmi výrobcu súpravy na izoláciu DNA.

Upozornenia a bezpečnostné opatrenia

- Pred použitím výrobku si pozorne prečítajte návod na použitie.
- Prečítajte si karty bezpečnostných údajov (SDS) a vyhlásenia oneškodnosti (NHS) všetkých výrobkov BIOTYPE, ktoré sú k dispozícii na požiadanie alebo na našej domovskej stránke (www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter). Pre výrobky, ktoré nevyžadujú KBÚ, pretože neobsahujú SVHC alebo podliehajú iným obmedzeniam nariadenia 1272/2008 (CLP), BIOTYPE poskytuje SDS na požiadanie.
- Obráťte sa na výrobcov požadovaných materiálov a činidiel, ktoré však nie sú poskytnuté, aby vám poskytli kópie kariet bezpečnostných údajov pre všetky dodatočne potrebné činidlá.
- Komponenty súpravy z rôznych šarží súpravy sa nesmú miešať.
- Alikvotovanie zložiek súpravy do iných reakčných nádob nie je povolené.
- Používanie tohto produktu je obmedzené na profesionálnych používateľov laboratórií, ktorí sú vyškolení v oblasti molekulárno-genetických techník, multiplexnej PCR a manipulácie s Genetic Analyzer spoločnosti Thermo Fisher Scientific.
- Pred prvým použitím skontrolujte, či výrobok a jeho súčasti pre nasledovné:
 - Integrita
 - Úplnosť z hľadiska počtu, typu a náplne (pozri kapitolu Poskytnuté materiály)
 - Správne označovanie
 - Zamŕzanie pri príchode (okrem Multi Taq 2 DNA Polymerase)
- So vzorkami by sa malo vždy zaobchádzať ako s infekčnými a/alebo biologicky nebezpečnými v súlade s bezpečnými laboratórnymi postupmi a správnou laboratórnou praxou.
- Nepoužívajte súpravu, ktorej uplynula doba použiteľnosti.
- Vzorky a odpad z analýzy zlikvidujte v súlade s miestnymi bezpečnostnými predpismi.
- Všetky použité prístroje boli nainštalované, kalibrované, kontrolované a udržiavané podľa pokynov a odporúčaní výrobcu.

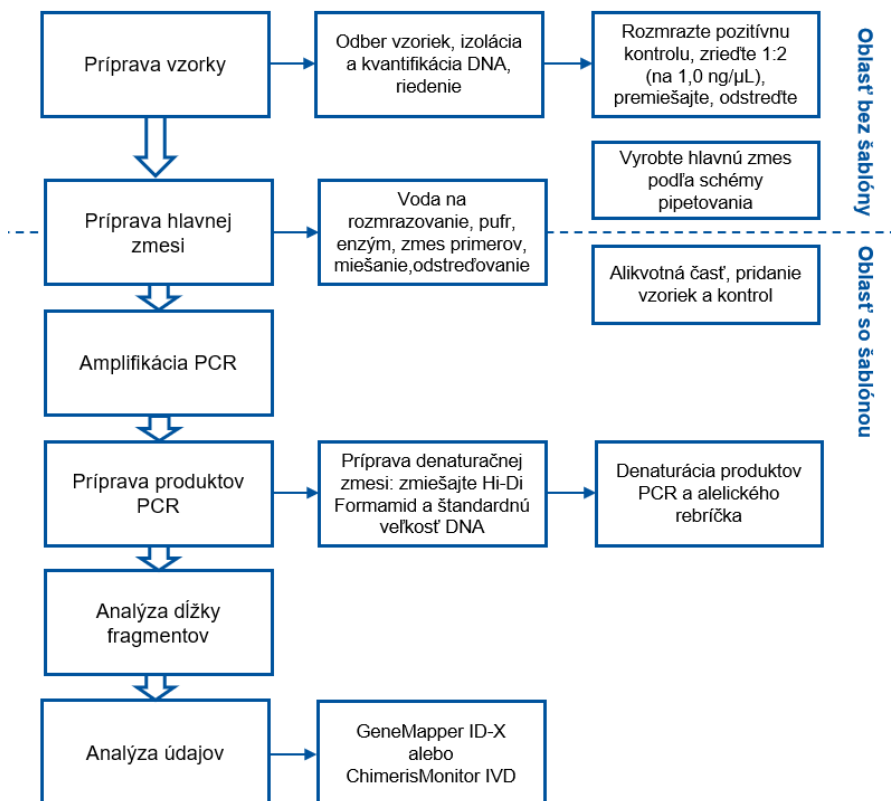
Upozornenie pre používateľa

Každý problém, ktorý sa vyskytne v súvislosti s výrobkom, musí používateľ nahlásiť výrobcovi. Akékoľvek závažné udalosti súvisiace s touto súpravou sa musia nahlásiť výrobcovi a príslušnému orgánu členského štátu, v ktorom je používateľ a/alebo pacient usadený.

Súhrn bezpečnosti a výkonu (SSP) je vytvorený v súlade s článkom 29 nariadenia (EÚ) 2017/746 a jeho cieľom je poskytnúť verejnosti prostredníctvom databázy EUDAMED prístup k aktualizovanému súhrnu údajov o bezpečnosti a výkone pomôcky určeným používateľom, v prípade tohto výrobku len laboratórnym odborníkom.

Postup

Prehľad experimentálneho pracovného postupu



Príprava vzorky

Požiadavky na surovú vzorku

Na nasledujúci postup odoberte aspoň 200 μL vzorky periférnej žilovej plnej krvi.

Manipulácia so surovým materiálom vzorky (periférnou žilovou plnou krvou) by sa mala riadiť odporúčaním Inštitútu pre klinické a laboratórne štandardy

(CLSI) MM05-A2 (2. vydanie), v ktorom sa uvádza, že plná krv sa môže skladovať pri izbovej teplote (22 °C až 25 °C) až 24 hodín alebo pri teplote 2 °C až 6 °C 72 hodín alebo dlhšie. Okrem toho sa odporúča, aby sa pri odbere celej krvi používali antikoagulantia EDTA, citrát alebo heparín.

POZNÁMKA



Dlhé skladovanie surového materiálu vzorky by mohlo viesť k fragmentácii genetického materiálu, a tým k nedostatočnej kvalite materiálu. To môže zhoršiť výsledok analýzy, napr. v dôsledku neúplných profilov.

Extrakcia DNA

Extrakciu a purifikáciu DNA zo vzoriek periférnej žilovej plnej krvi vykonajte podľa pokynov výrobcu. V rámci hodnotenia výkonu výrobku boli overené tieto súpravy:

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit
- Macherey-Nagel NucleoSpin® Dx Blood, CE certifikovaná minisada na DNA z krvi

POZNÁMKA



Kontaminácia krvi sa dá vizuálne zistiť v reakcii PCR alebo v izolovanej DNA pomocou oranžového farebného posunu. Ak sa zistí zmena farby, odporúčame izoláciu DNA zopakovať, aby sa predišlo prípadnej interferencii.

POZNÁMKA



Pred elúciou nukleovej kyseliny sa uistite, že ste odstránili všetky stopy etanolu. Etanol je silný inhibítor PCR.

Kvantifikácia a riedenie DNA

Kvantifikujte koncentráciu DNA pomocou UV/VIS spektroskopie pri 260 nm pomocou spektrofotometra NanoDrop alebo pomocou fluorescenčnej spektroskopie s použitím Qubit Fluorometer™.

Pri použití spektrofotometrie použite na meranie slepého pokusu elučný pufr zo súpravy na extrakciu DNA. Pomer A_{260}/A_{280} by sa mal pohybovať v rozmedzí 1,7 - 1,9, zatiaľ čo pomer A_{260}/A_{230} by mal byť v rozmedzí 1,8 - 2,3.

Na fluorometrickú kvantifikáciu DNA možno použiť Qubit™ Fluorometer s Qubit 1x dsDNA HS Assay-Kit alebo Qubit dsDNA BR Kit.

Na použitie so súpravou Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit zried'te vzorky DNA na optimálnu koncentráciu 2,0 ng/μL. Riedenie pripravte čerstvo pred použitím. Ako riedidlo použite Nuclease-Free Water.

POZNÁMKA

i

Celkový vstupný rozsah súpravy je 0,125 - 2,0 ng DNA na reakciu, **optimálny vstup je 2 ng DNA** na reakciu za štandardných podmienok pre najvyššiu citlivosť. Vstup pod 0,125 ng by mohol viesť k neúplným profilom, vyšší vstup by mohol viesť k vytiahnutým píkom.

Ukladanie DNA

Pri dlhodobom skladovaní by sa DNA mala skladovať neriedená pri teplote -25 °C až -15 °C alebo podľa informácií výrobcu súpravy na izoláciu DNA.

Príprava kontroly

Pozitívna kontrola PC

Rozmrzajte Control DNA XY82, homogenizujte ju vírením a následným krátkym odstredením. Zried'te Control DNA XY82 1:2 z 2,0 ng/μL na 1,0 ng/μL pomocou Nuclease-Free Water.

Zriedený PC homogenizujte krátkym vírením. Potom zriedený PC krátko odstredíte (približne 10 s). Zriedenú pozitívnu kontrolu neskladujte.

POZNÁMKA



Vždy použite čerstvé riedenie Control DNA XY82.

Kontrola bez šablón NTC

Namiesto vzorky použite Nuclease-Free Water, ktorá je súčasťou súpravy, ako kontrolu bez templátu (NTC).

Nastavenie hlavného mixu

Zo súpravy Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit vyberte nasledujúce komponenty na nastavenie hlavnej zmesi:

- Nuclease-Free Water (svetlomodrý uzáver)
- Reaction Mix A (fialový uzáver)
- Mentype® DIPscreen Primer Mix (červený uzáver)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (biely uzáver)

Všetky zmrazené zložky by sa mali rozmraziť pri izbovej teplote (22 °C až 28 °C, približne 30 minút, chránené pred svetlom) a homogenizovať prevrátením skúmaviek alebo jemným vírením. Potom reagenty krátko odstredíte (približne 10 s). V záujme dodržiavania zásad správnej laboratórnej praxe sa odporúča, aby ste Multi Taq 2 DNA Polymerase pred nastavením hlavného mixu uchovávali čo najdlhšie v chladnom prostredí (napr. v chladiacom stojane).

POZNÁMKA



Multi Taq 2 DNA Polymerase premiešajte, aby bola dlhšie stabilná - **enzým nemiešajte vírením.**

Pripravte hlavnú zmes PCR podľa Tabuľka 4 do mikrocentrifugačnej skúmavky vhodnej veľkosti pre celkový počet vzoriek, ktoré sa majú testovať,

vo vyhradenom čistom priestore. Do výpočtu zahrňte aspoň jeden PC a jeden NTC.

POZNÁMKA

i

Platí pravidlo, že ak testujete menej ako 10 vzoriek, použite dostatočné množstvo hlavnej zmesi pre jednu vzorku navyše. Ak testujete 10 alebo viac vzoriek, použite nadbytočný objem hlavnej zmesi činidiel +10 %.

Tabuľka 4 Nastavenie reakcie PCR hlavnej zmesi, * Objem závisí od koncentrácie DNA. Ak sa použije väčší objem šablóny DNA, nezabudnite upraviť objem Nuclease-Free Water. Celkový objem reakcie (rxn) musí byť vždy 25,0 µL.

Komponent	Objem		
	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
Vzorka DNA alebo kontrolná vzorka	1,0 µL *	5 x 1,0 µL *	10 x 1,0 µL *
Celkový objem	25,0 µL	125,0 µL	250,0 µL

Zmiešajte hlavnú zmes jemným vírením a potom zmes krátko odstredíte.

Do pripravených 200 µL PCR skúmaviek alikvotne rozdeľte 24,0 µL PCR hlavnej zmesi a uzavreté skúmavky krátko odstredíte.

Použitie šablón DNA a kontrol

Do pripravených skúmaviek PCR obsahujúcich PCR hlavnú zmes pridajte 1,0 µL nasledujúcich typov vzoriek.

NTC: namiesto vzorky pridajte 1,0 µL Nuclease-Free Water.

Vzorka: pridajte 1,0 µL pripravenej, zriedenej vzorky gDNA (2,0 ng/µL).

PC: namiesto vzorky pridajte 1,0 µL pripravenej Control DNA XY82 zriedenej v pomere 1:2 (1,0 ng/µL).

POZNÁMKA

Najprv pripravte NTC, aby ste zabránili kontaminácii kontroly. PC pripravte ako poslednú, aby ste zabránili krížovej kontaminácii vzoriek.

POZNÁMKA

Použite aspoň jednu pozitívnu kontrolu (PC) a jednu kontrolu bez šablóny (NTC) na jeden cyklus. V opačnom prípade nie je možné cyklus potvrdiť.

Zatvorte všetky skúmavky PCR, jemne ich premiešajte a roztočte.

Amplifikácia PCR

Naprogramujte PCR cyklér s nasledujúcim profilom amplifikácie, nezabudnite nastaviť rampu na 4 - 5 °C/s. Vykonajte "horúci štart" PCR, aby ste aktivovali polymerázu a zabránili vzniku nešpecifických produktov amplifikácie.

Tabuľka 5 Protokol PCR

Teplota	Čas	
94 °C	4 min	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	28 cyklov
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	podržte

POZNÁMKA

Ak sa používajú tepelné cykléry s nastaviteľnými krokmi ohreву a chladenia, **nastaví sa nábeh na 4 - 5 °C/s**, aby sa zabezpečila optimálna rovnováha signálu.

POZNÁMKA



Základné informácie o nastavení, programovaní a údržbe rôznych prístrojov PCR nájdete v používateľskej príručke príslušného prístroja.

POZNÁMKA



Veľmi malé množstvá DNA môžu mať za následok štatistické výpadky a nerovnováhu vrcholov. Zvýšenie počtu cyklov PCR zvyšuje riziko krížovej kontaminácie spôsobenej minimálnym množstvom nečistôt. Okrem toho by sa mohli objaviť nešpecifické produkty amplifikácie.

Kapilárna gélová elektroforéza

Príprava produktov PCR

Po dokončení PCR vyberte vzorky z cykléra a krátko odstredte.

POZNÁMKA



Po dokončení PCR sa produkty PCR môžu skladovať až 4 týždne pri teplote 2 °C až 8 °C alebo dlhodobo pri teplote -25 °C až -15 °C chránené pred svetlom.

Činidlá rozmrazte, premiešajte a odstredte:

- Hi-Di™ Formamide (nie je súčasťou súpravy)
- Mentype® DIPscreen Allelic Ladder (zelený uzáver)
- DNA Size Standard BTO (550) (oranžový uzáver)

Pripravte denaturačnú zmes opísanú v Tabuľka 6 a pridajte jednu alebo dve reakcie na kompenzáciu odchýlok pri pipetovaní. Zahrňte dodatočnú reakciu pre alelický rebríček.

Tabuľka 6 Denaturačná zmes

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

Pipetujte 12,0 µL denaturačnej zmesi do jamiek PCR platne (vhodnej na použitie v Genetic Analyzer).

Do jamiek pridajte buď 1,0 µL PCR produktu, alebo 1,0 µL Mentype® DIPscreen Allelic Ladder. Utesnite PCR platňu vhodnou fóliou, krátko ju premiešajte a odstredte.

POZNÁMKA

Alelický rebríček sa používa na správne určenie analyzovaných fragmentov počas analýzy údajov. V každom cykle analýzy dĺžky fragmentov sa musí alelický rebríček analyzovať aspoň raz, aby sa zabezpečilo úspešné vyhodnotenie údajov.

POZNÁMKA

Kapiláry zariadenia na gélovú elektroforézu by nikdy nemali byť suché. Ak vzorky nezaberú všetky miesta kapiláry, naplňte ďalšie jamky platne s 12,0 µL Hi-Di™ Formamide podľa počtu kapilár.

Pripravené produkty PCR denaturujte na PCR cykléri 3 minúty pri 95 °C a potom vzorky v cykléri ochladte na 4 °C. Pred analýzou dĺžky fragmentov vzorky krátko odstredte.

Analýza dĺžky fragmentov

Pred vykonaním prvej analýzy dĺžky fragmentov spustíte Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE GmbH), aby ste vykonali spektrálne vyrovnanie použitých fluorescenčných farbív pre Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit (6-FAM™, BTG, BTY, BTO).

POZNÁMKA

Pri inštalácii zariadenia Matrix Standard BT5 multi si prečítajte návod na použitie. Ten je k dispozícii na adrese www.biotype.de/en/ifus alebo na požiadanie prostredníctvom support@biotype.de spoločnosťou BIOTYPE GmbH.

Po úspešnom spustení Matrix Standard BT5 multi importujte poskytnuté nastavenia prístroja pre 3500 Series Genetic Analyzer podľa opisu v Tabuľka 7 (www.biotype.de/en/template-files).

Tabuľka 7 Poskytnuté súbory pre Genetic Analyzer
www.biotype.de/en/template-files)

3500 Series Genetic Analyzer	
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

Špecifikácie požadovaného protokolu prístroja sú opísané v Tabuľka 8. Upravovať by sa mali len opísané parametre, ostatné parametre by mali zostať v predvolenom nastavení. Pri nastavovaní konkrétnych prevádzkových parametrov postupujte podľa návodu na použitie od výrobcu.

Tabuľka 8 Parametre modulov cyklu rôznych zariadení na kapilárnu gélovú elektroforézu

	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

Odišne od hodnôt uvedených v Tabuľka 8 sa čas cyklu môže upraviť podľa dĺžky použitého kapilárneho poľa, ale je povinné analyzovať všetky fragmenty (60 - 550 bp) DNA Size Standard 550 (BTO).

Ak chcete nastaviť Size Standard Protocol, musia byť oranžovému panelu priradené nasledujúce veľkosti pre 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 a 550 bp.

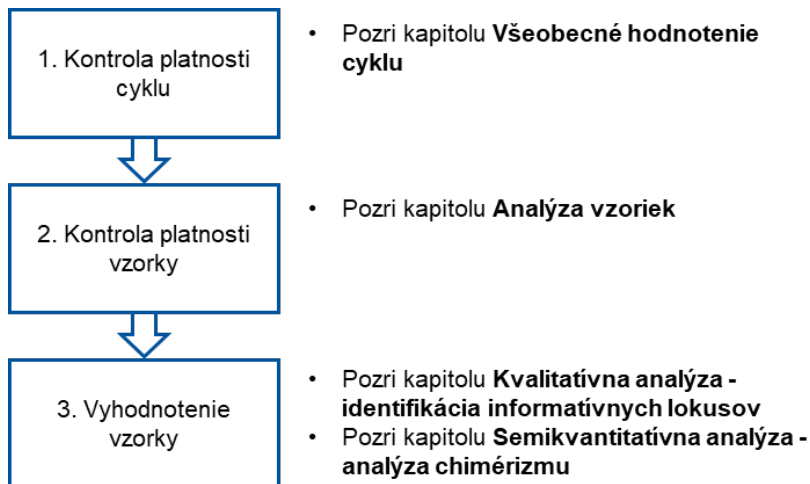
POZNÁMKA

i

BIOTYPE GmbH poskytuje špecifické šablóny na jednoduchú inštaláciu špecifických nastavení cyklu pre analýzu dĺžky fragmentov, ako aj šablóny analýzy na jednoduché nastavenie softvéru GeneMapper™ ID-X. Tieto šablóny sú k dispozícii na stiahnutie prostredníctvom: www.biotype.de/en/template-files.

Analýza údajov

Všeobecný postup analýzy údajov

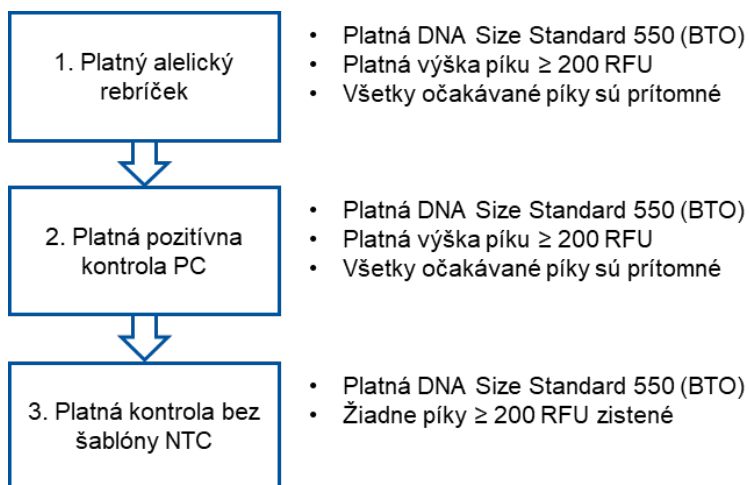


POZNÁMKA



Analýza údajov sa musí vykonať buď pomocou softvéru ChimerisMonitor IVD alebo softvéru GeneMapper™ ID-X (Thermo Fisher Scientific). Manuálne vyhodnotenie súborov fsa alebo akýchkoľvek výsledkov poskytnutých pomocou softvéru na zber údajov bez jednej z dvoch opísaných možností softvéru na analýzu a vyhodnotenie údajov sa neoveruje.

Overenie správnosti spustenia pracovného postupu



POZNÁMKA



Na posúdenie správnosti by sa mal analyzovať rozsah merania 50 - 560 bp.

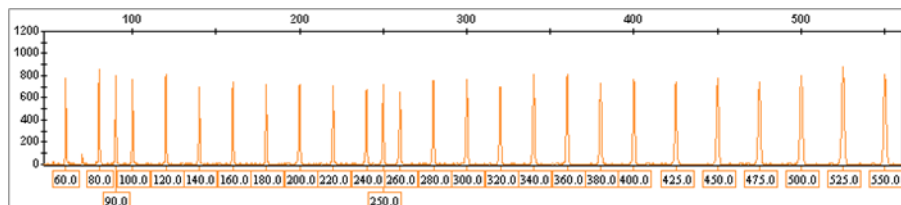
DNA Size Standard 550 (BTO)

Zistenie presnej dĺžky amplifikovaných produktov závisí od typu zariadenia, podmienok elektroforézy, ako aj použitého štandardu veľkosti DNA. Vzhľadom na zložitosť niektorých lokusov by sa určenie veľkosti malo zakladať na rovnomerne rozložených referenciách.

Skontrolujte DNA Size Standard 550 (BTO) vo všetkých vzorkách podľa týchto kritérií:

- Prítomnosť všetkých fragmentov na: **60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 a 550 bp**
- Všetky fragmenty sú prítomné s výškou píku nad hraničnou hodnotou **≥ 50 RFU**
- Koeficient determinácie **$R^2 > 0,995$** .

- Výška píku fragmentov sa neznižuje kontinuálne s rastúcou dĺžkou fragmentu.



Obrázok 1 Elektroferogram DNA Size Standard 550 (BTO), fragmenty s dĺžkami v bp

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder

Po zabezpečení platného štandardu veľkosti skontrolujte, či sú v alelickom rebríčku prítomné všetky dostupné píky s výškou píku nad hraničnou hodnotou ≥ 200 RFU.

POZNÁMKA



Mentype® DIPscreen Allelic Ladder obsahuje fragmenty pre každú detekovateľnú alelu. Porovnajte alely s prílohou Tabuľka 20 a Obrázok 5.

Control DNA XY82 (PC)

Po zabezpečení platného veľkostného štandardu sa uistite, že je prítomný úplný profil DNA všetkých špecifických píkov pre PC s výškou píku ≥ 200 RFU (pozri Tabuľka 9). Control DNA XY82 je kvalitatívna kontrola PCR na zabezpečenie všeobecnej výkonnosti hlavnej zmesi.

Control DNA XY82 (pozri prílohu Obrázok 6), ktorá je súčasťou testovacej súpravy, predstavuje tieto alely:

Tabuľka 9 Genotyp Control DNA XY82, - = Delecia, + = Insercia

Lokus	Control DNA XY82	Lokus	Control DNA XY82
FAM Panel (modrý kanál)		BTG Panel (zelený kanál)	
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 (žltý kanál)	
HLD105	-/-	HLD48	-/-
HLD140	-/+	HLD114	-/-
HLD163	-/+	HLD304	-/+
		HLD131	+/+
		HLD38	+/+
		HLD82	+/+

Kontrola bez šablón NTC

Po zabezpečení platného štandardu veľkosti skontrolujte, či sa v rozsahu binov NTC nezistili žiadne píky nad hraničnou hodnotou ≥ 200 RFU (pozri prílohu Obrázok 6).

POZNÁMKA

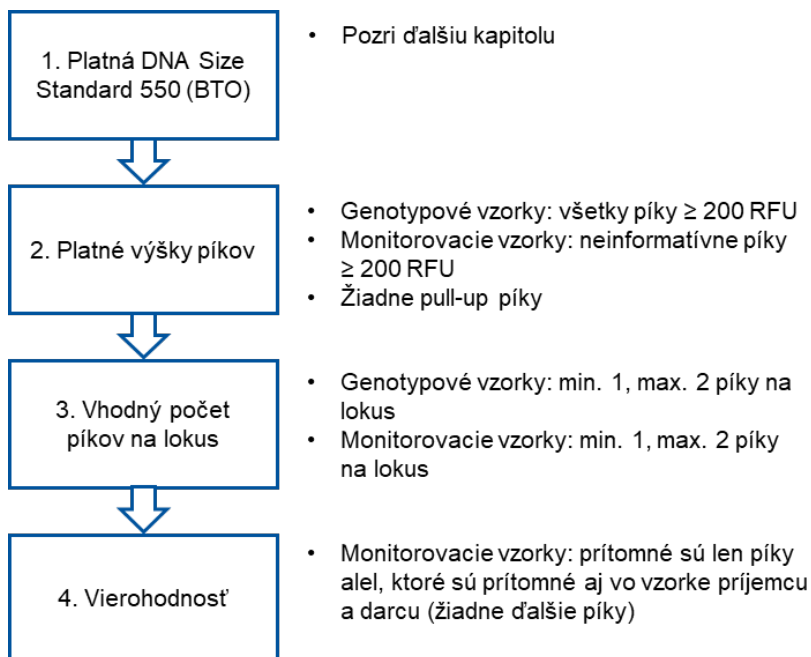
Pri použití ChimerisMonitor IVD alebo GeneMapper™ ID-X spolu s dodanými vzorovými súbormi pre Analysis Method sa vrcholy < 200 RFU automaticky nepriradia k názvu alely, čo vám pomôže ľahko vyhodnotiť výsledky.

POZNÁMKA

V NTC sa môžu výraznejšie vyskytovať artefakty, ako sú malé farebné škvrny. Vzhľadom na širokú základňu pík, abnormálny tvar pík a žiadne priradenie pík je možné odlišenie od pík ampikonov.

Analýza vzoriek

Analýza údajov o pracovných postupoch



Pomocou softvéru ChimerisMonitor IVD sa automaticky vykonávajú opísané validačné kroky pre cyklus a vzorky.

Pomocou softvéru GeneMapper™ ID-X spolu so špecifickými šablónami, ktoré poskytuje BIOTYPE GmbH, sa základná validácia vykonáva automaticky.

Kvalitatívna analýza - identifikácia informatívnych lokusov

V nasledujúcej časti sa vysvetľuje identifikácia a rozlíšenie lokusov špecifických pre príjemcu. Preto sú lokusy špecifické pre darcu definované ako neinformatívne. Identifikácia informatívnych lokusov sa vykonáva na základe údajov od príjemcu a darcu pred transplantáciou. Príklady nájdete v Tabuľka 21 - Tabuľka 22 v prílohe.

Pomocou softvéru ChimerisMonitor IVD je podporovaná identifikácia informačných lokusov.

Informatívne lokusy: Jednu alelu vo vzorke príjemcu nemožno zistiť vo vzorke darcu.

Neinformatívne lokusy: Lokusy, v ktorých sa vrchol(y) špecifický(é) pre príjemcu prekrýva(jú) s vrcholom(mi) špecifickým(i) pre darcu, alebo lokusy špecifické pre darcu.

Semikvantitatívna analýza - analýza chimérizmu

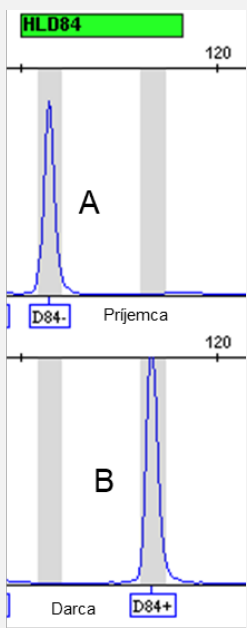
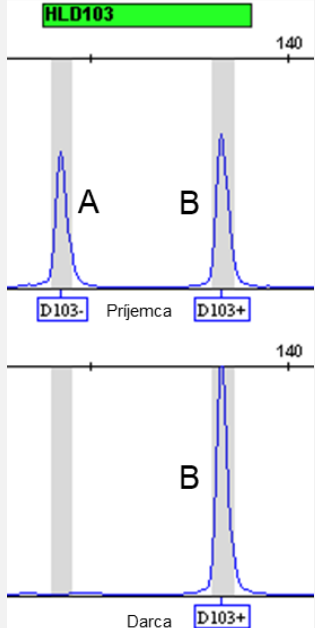
Semikvantitatívna analýza chimérizmu sa vykonáva podľa opisu v literatúre, napr. Clark et al. (2015) [1] alebo Nollet et al. (2001) [2]. Vzorce pre kvantifikáciu závisia od alelickej konštelácie v lokuse a sú uvedené v nasledujúcej Tabuľka 10 (upravené podľa Clark et al.). Hodnota chimérizmu sa vypočíta pre každý vopred vybraný informatívny lokus. Potom sa vypočíta priemerná hodnota všetkých hodnôt chimérizmu špecifických pre daný lokus.

POZNÁMKA



Na identifikáciu odľahlých hodnôt sa odporúča vyhodnotiť každý SD_{Marker} . SD_{Marker} pre vzorky s nízkym zmiešaným chimérizmom ($< 5\%$ MC) by nemal presiahnuť 4 %. Pri strednom až vysokom zmiešanom chimérizme ($> 5\%$ MC) SD_{Marker} by nemal prekročiť 10 %. Ak SD_{Marker} prekročí limity, odporúča sa opätovne analyzovať hodnoty MC vybraných markerov na odľahlé hodnoty.

Tabuľka 10 Polokvantitatívna analýza chimérizmu (upravené podľa Clark et al. [1])

Scenár 1	Scenár 2
žiadne spoločné alely: príjemca je homozygot, darca je homozygot, žiadne píky nie sú spoločné 	jedna spoločná alela (homozygotná): príjemca je heterozygot, darca je homozygot, jeden pík je spoločný 
Pomer príjemcov: $\% \text{ chimérizmus} = \frac{A}{A+B} \times 100\%$	Pomer príjemcov: $\% \text{ chimérizmus} = \frac{A}{\left(\frac{B-A}{2}\right) + A} \times 100\%$

Analýza údajov pomocou ChimerisMonitor IVD

ChimerisMonitor IVD je pokročilý softvér na automatizovanú analýzu údajov, vyhodnotenie priebehu a výpočet chimérizmu. Integrovaná **Patient Management** umožňuje sledovať kinetiku chimérizmu v prehľadoch s vysokým rozlíšením, ale aj v grafoch a tabuľkovej vizualizácii.

Všeobecné pokyny na analýzu vzorky nájdete v návode na použitie softvéru ChimerisMonitor IVD.

Všetky požadované šablóny analýz sú zahrnuté v **Test Kit Management** systému ChimerisMonitor. Tie obsahujú metódy analýzy, ako aj prepojené šablóny Bin a Panel. Softvér vykonáva všeobecné, integrované vyhodnotenie chodu počas dávkového importu podľa kapitoly Overenie správnosti spustenia pracovného postupu. Všeobecný opis pracovného postupu analýzy údajov ChimerisMonitor nájdete v Tabuľka 11.

POZNÁMKA

i

Analýza údajov sa musí vykonať buď pomocou softvéru ChimerisMonitor IVD alebo softvéru GeneMapper™ ID-X (Thermo Fisher Scientific). Manuálne vyhodnotenie súborov fsa alebo akýchkoľvek výsledkov poskytnutých pomocou softvéru na zber údajov bez jednej z dvoch opísaných možností softvéru na analýzu a vyhodnotenie údajov sa neoveruje.

Tabuľka 11 Pracovný postup analýzy chimérizmu s ChimerisMonitor

Č.	Ikona	Pracovný krok
1	 	Import vzorky Create new patient. Databáza všetkých vytvorených pacientov je zastúpená v Správe pacientov Batch Import: - Výber testovacej súpravy Biotype Mentype DIPscreen - Všetky prahové hodnoty pre správny priebeh a vyhodnotenie vzorky sú spojené s príslušnou metódou analýzy. - Importujte cyklus obsahujúci súbory fsa alelického rebríčka, pozitívnej kontroly, kontroly bez šablóny a vzoriek.

Č.	Ikona	Pracovný krok
		- Vyberte typy vzoriek manuálne (nevyhnutné pre správne priradenie píkav a výpočet chimérizmu) - Všeobecné vyhodnotenie cyklu a vzoriek vykonáva softvér Otvorte Batch Import View Assign Sample: Vyberte vzorku a priradte ju k pacientovi
2		Kontrolné kontroly - ChimerisMonitor vykonáva integrované hodnotenie kvality, ako aj hodnotenie cyklu a vzorky Skontrolujte Allelic Ladder Electropherogram a Size Calling Regression Zobrazia sa prípadné upozornenia na kvalitu: - V rámci karty Evaluation of Allelic Ladders počas dávkového importu - V rámci karty FSA Import Warnings v Editore pacienta Skontrolujte Positive Control Electropherogram a Size Calling Regression Evaluation of Positive and No Template Controls počas dávkového importu zobrazuje možné upozornenia na kvalitu. Skontrolujte No Template Control Electropherogram a Size Calling Regression Evaluation of Positive and No Template Controls počas importu dávky zobrazuje možné upozornenia na kvalitu
3	 	Skontrolujte Sample Electropherogram Správne priradenie píkav je nevyhnutné na presnú definíciu informačných markerov a spoľahlivý výpočet chimérizmu. Sample Quality Kontrola kvality počas dávkového importu zobrazuje možné upozornenia na kvalitu Kontrola veľkosti vzorky pri volaní regresie Sample Quality Kontrola kvality počas dávkového importu zobrazuje možné upozornenia na kvalitu
4		Definícia informačných markerov Create a new transplantation: na monitorovanie pacienta možno vybrať preddefinované markery
5		Analýza chimérizmu Calculate Chimerism: Pozrite si vopred vybrané markery pre analýzu chimérizmu a vykonajte výpočet chimérizmu (chimérizmus jedného markera, celkový chimérizmus a štandardná odchýlka)

Č.	Ikona	Pracovný krok
6	Správa	
		Create Report: Jednotlivé hodnoty a kinetika chimérizmu sa zobrazujú v čase (tabuľka a graf, formát súboru pdf alebo csv)
7		Vytvorenie databázového systému pre Patient Management

Analýza údajov pomocou GeneMapper™ ID-X

Príprava GeneMapper™ ID-X softvéru

Všeobecné pokyny na používanie a analýzu vzoriek pomocou tohto softvéru nájdete v príručke používateľa softvéru GeneMapper™ ID-X.

Priradenie alel sa vykoná pomocou analytického softvéru GeneMapper™ ID-X v kombinácii so šablónovými súbormi Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit od BIOTYPE GmbH. Súbor šablón BIOTYPE (pozri Tabuľka 12) sú k dispozícii na našej domovskej stránke (<https://www.biotype.de/en/template-files>) na stiahnutie alebo na požiadanie prostredníctvom support@biotype.de. Pracovný postup analýzy chimérizmu pomocou softvéru GeneMapper™ ID-X je uvedený v Tabuľka 13.

Tabuľka 12 BIOTYPE GmbH šablóny pre GeneMapper™ ID-X softvér, šablóny špecifické pre aplikáciu #POP-4™ alebo § POP-7™

Šablóna	Názov šablóny	
Panels*	DIPscreenIVD_Panel4_v1x [#] DIPscreenIVD_Panel7_v1x [§]	alebo vyššie verzie
Bin Sets*	DIPscreenIVD_Bins4_v1x [#] DIPscreenIVD_Bins7_v1x [§]	alebo vyššie verzie
Size Standard*	BTO_60-550_v1x	alebo vyššie verzie
Analysis Method*	DIPscreenIVD_Analysis4_v1x [#] DIPscreenIVD_Analysis7_v1x [§]	alebo vyššie verzie
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 Alleles Table for 10 Alleles	

*Tieto šablóny sa musia vždy použiť na analýzu údajov. Ostatné súbory šablón sú voliteľné.

POZNÁMKA

i

Import a volanie alel s poskytnutými súbormi šablón je zaručené len vtedy, ak sa používa softvér GeneMapper™ ID-X. Pri použití softvéru GeneMapper™ sa môžu vyskytnúť problémy s importom niektorých šablónových súborov. Je možné, že budete musieť upraviť panely a biny s jedným alebo viacerými cyklami alelického rebríčka na konkrétnom nastavení prístroja. Kontaktujte nás pre podporu (support@biotype.de).

Tabuľka 13 Pracovný postup analýzy chimérizmu s GeneMapper™ ID-X

Č.	Ikona	Pracovný krok										
1		Príprava softvéru										
		Panel Manager Importovať poskytnuté súbory šablón pre Panel, Bins										
		GeneMapper™ ID-X Manager Importovať poskytnutú šablónu pre Analysis Method a Size Standard										
2		Import vzorky										
		Add Samples to Project - vyhľadajte priečinok, vyberte a Add to List → Add										
3		Analýza vzoriek										
		Vyberte nasledujúce vlastnosti v príslušných stĺpcoch vzorového listu a vyberte Analyze .										
		<table><tr><th>Názov stĺpca</th><th>Vybrať</th></tr><tr><td>Sample Type</td><td>Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control alebo Sample</td></tr><tr><td>Analysis Method</td><td>Vyberte predtým importované Šablóna BIOTYPE GmbH DIPscreenIVD_Analysis_v1x</td></tr><tr><td>Panel</td><td>Vyberte predtým importované Šablóna BIOTYPE GmbH DIPscreenIVD_Panel_v1x</td></tr><tr><td>Štandardná veľkosť</td><td>Vyberte predtým importované BIOTYPE GmbH šablóna BTO_60-550_v1x</td></tr></table>	Názov stĺpca	Vybrať	Sample Type	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control alebo Sample	Analysis Method	Vyberte predtým importované Šablóna BIOTYPE GmbH DIPscreenIVD_Analysis_v1x	Panel	Vyberte predtým importované Šablóna BIOTYPE GmbH DIPscreenIVD_Panel_v1x	Štandardná veľkosť	Vyberte predtým importované BIOTYPE GmbH šablóna BTO_60-550_v1x
Názov stĺpca	Vybrať											
Sample Type	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control alebo Sample											
Analysis Method	Vyberte predtým importované Šablóna BIOTYPE GmbH DIPscreenIVD_Analysis_v1x											
Panel	Vyberte predtým importované Šablóna BIOTYPE GmbH DIPscreenIVD_Panel_v1x											
Štandardná veľkosť	Vyberte predtým importované BIOTYPE GmbH šablóna BTO_60-550_v1x											

Č.	Ikona	Pracovný krok
4		Kontrola kontrol
		Kontrola platnosti kontroly (Allelic Ladder, Positive Control, No Template Control)
		Pri dostatočných výškach píkov sa priradenie vykoná podľa špecifikácií v Analysis Method
5		Vzorové hodnotenie
		Skontrolujte platnosť vzorky.
		Pri dostatočných výškach píkov sa priradenie vykoná podľa špecifikácií v Analysis Method
		Ak nie sú píky priradené, hoci sa dosiahli dostatočné výšky, je možné ich priradiť manuálne. Skontrolujte hodnotnosť všetkých úloh pík.
6		Definícia informačných markerov
		Porovnajte genotypy príjemcu a darcu, potom manuálne identifikujte informatívne markery (Pozri prílohu, <u>Príklady pre kvalitatívne hodnotenia lokov</u>)
7		Analýza chimérizmu
		Exportujte Sizing Table a vypočítajte hodnoty chimérizmu podľa <u>Tabuľka 10</u> - pozri kapitolu <u>Semikvantitatívna analýza - analýza chimérizmu</u>

POZNÁMKA

i

Pomocou dodaných vzorových súborov pre Analysis Method, Bins, Panels, a výberom príslušného typu vzorky softvér automaticky skontroluje platnosť týchto vzoriek. Príznaky kontroly kvality SOS (Sample off-Scale), SQ (Sizing Quality), OMR (Outside Marker Range) sú zelené políčka pre úspešnú platnosť.

ARNM	SOS	SQ	SSPK	MIX	OMR	CGQ
						

POZNÁMKA

Na vyhodnotenie štandardu veľkosti použite Size Match Editor v aplikácii GeneMapper™ ID-X. Ak automatické vyvolanie fragmentu zlyhalo, triplety 80 / 90 / 100 bp a 240 / 250 / 260 bp sa môžu použiť na orientáciu pri manuálnom priradení píkovo.

Riešenie problémov

Post-PCR analýza a automatické priradenie alel pomocou vhodného analytického softvéru zabezpečuje presné a spoľahlivé rozlíšenie alel.

Automatický výpočet pomeru darcovskej a príjemcovskej DNA, ako aj štandardných odchýlok a detekčných limitov možno získať priamo zo surových údajov analýzy veľkosti fragmentov.

Ak sa majú výsledky získané pomocou Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit zosúladiť s výsledkami cytologických analýz, uistite sa, že cytologické analýzy boli vykonané s najmenej 200 leukocytmí.

Pull-up píky

Pull-up píky sa môžu vyskytnúť, ak sú výšky píkovo mimo lineárneho detekčného rozsahu alebo ak bola použitá nesprávna matrica. Môžu sa objaviť na miestach špecifických píkovo v iných farebných paneloch, zvyčajne s nižšou intenzitou signálu. Pri pravidelnom pozorovaní zvážte opakovanie generovania matrice a skontrolujte, či nedošlo k preťaženiu DNA.

Pridávanie nukleotidov nezávisle od šablóny

Multi Taq 2 DNA Polymerase má vďaka svojej terminálnej transferázovej aktivite tendenciu pridávať adenosínový radikál na 3'-koniec amplifikovaných fragmentov DNA. Artefaktový pík je o jednu bázu kratší, ako sa očakávalo (pík -1 bp). Všetky priméry BIOTYPE sú navrhnuté tak, aby minimalizovali tieto artefakty. Tvorba artefaktov sa ďalej znižuje záverečným krokom predĺženia protokolu PCR pri 68 °C počas 60 min. Výška píku artefaktov koreluje s množstvom DNA. Laboratória by mali definovať svoje individuálne limity pre analýzu píkovo.

Artefakty

Izbová teplota môže ovplyvniť výkonnosť produktov PCR na multikapilárnych prístrojoch a môžu sa vyskytnúť ramenné píky alebo rozdelené píky. Okrem toho by v niektorých prípadoch mohlo byť ovplyvnené automatické pridelovanie. Ak sa tieto účinky vyskytnú, odporúčame opätovne vstreknúť vzorku pri vyššej izbovej teplote a možno použiť viac ako jednu vzorku alelického rebríčka na jeden test.

Vo vzorkách sa môžu vyskytnúť aj artefakty, ako sú malé škvrny farby, a ešte výraznejšie v NTC. Vzhľadom na širokú základňu pík, abnormálny tvar pík a žiadne priradenie pík je možné odlíšenie od pík amplikonov.

Odchýlky pri pipetovaní

Analýza robustnosti Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ukázala, že súprava je robustná voči malým odchýlkam od opísaného protokolu (odchýlka +/- 10 %). Stredná odchýlka (+/- 20 %) od opísaného experimentálneho protokolu môže byť kritickejšia pre analýzu zmiešaného chimérizmu (najmä pri nízkych percentách chimérizmu). Je veľmi dôležité venovať osobitnú pozornosť Reaction Mix A PCR puferu. Odchýlka -20 % v tomto puferi môže mať za následok výrazné zníženie výšky signálu alebo dokonca nedetekovateľné markery. Aby sa minimalizovali akékoľvek odchýlky, odporúčame používať kalibrované pipety, presné pipetovanie a dôkladné miešanie.

Odlahlé hodnoty

Na identifikáciu odlahlých hodnôt sa odporúča vyhodnotiť štandardnú odchýlku v rámci markerov (SD_{Marker}). Ak SD_{Marker} pre vzorky s nízkym zmiešaným chimérizmom (< 5 % MC) prekročí 4 % a pre vzorky so stredným až vysokým zmiešaným chimérizmom (> 5 % MC) 10 %, zvážte opätovnú analýzu hodnôt MC bez tejto špecifickej odlahlej hodnoty.

Vplyv polymérov

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit bola validovaná a certifikovaná na analýzu na POP-4™ a POP-7™ polyméroch.

Pri použití polyméru POP-7™ sa v prednej časti elektroferogramov môžu objaviť škvrny farbiva. V modrom kanáli boli pozorované najmä farebné škvrny do veľkosti 110 bp, ktoré by mohli ovplyvňovať lokus HLD106. Pred

vykonaním analýzy chimérizmu skontrolujte elektroferogramy na takéto účinky.

Použitie iných polymérov (napr. POP-6™) môže ovplyvniť cyklus špecifických produktov PCR. Okrem toho sa môže zvýšiť šum pozadia v dôsledku odlišného správania sa voľných fluorescenčných farbív.

Hodnotenie výkonu

Analytická špecifickosť

Pomocou softvéru Genemapper™ ID-X sme testovali automatické určovanie alel pomocou alelického rebríčka a zhodu priradenia alel v porovnaní s predbežným určovaním testovanej DNA pomocou iných metód (iné PCR súpravy).

Vyhodnotili sme osemdesiatjeden predcharakterizovaných vzoriek DNA analyzovaných pomocou Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Zistili sa kompletne profily s výškou píku ≥ 200 RFU. Po určení nastavení zariadenia špecifických pre test bol všetkým vzorkám DNA priradený správny genotyp pre všetky systémy DIP a marker amelogenin. Okrem toho sme hodnotili špecifickosť primérov Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Neboli pozorované žiadne nešpecifické chybné produkty PCR, čím sa zabezpečila špecifickosť primérov Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit.

Interferenty a krížové reakcie

Potenciálne interferenty, ktoré by mohli ovplyvniť výsledky postupu merania, boli vyhodnotené v súlade s odporúčaniami usmernení CLSI EP07 (3. vydanie), EP37 (1. vydanie). Pre Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit sa určili endogénne a exogénne interferenty, otestovala sa ich maximálna očakávaná koncentrácia ($C_{\max}$) v reakcii PCR, ako sa navrhuje v usmerneniach, a v prípade, že sa pozorovala interferencia, otestovali sa ďalšie koncentrácie na určenie koncentrácie, pri ktorej nie je zistiteľná žiadna interferencia.

Výsledky ukázali rušivý účinok endogénnej interferentnej krvi testovanej na $2,57E-03$ % v/v v reakcii PCR na meranie úplného profilu DNA jedného genotypu. Okrem toho sa pozorovali odchýlky od neliečenej skupiny pri vzorkách zmiešaného chimérizmu meraných pri 2 %, 5 % a 30 % MC. Výsledky boli mimo limitov presnosti, a preto vykazovali interferenciu s reakciou PCR. Kontamináciu krvi však možno vizuálne zistiť v reakcii PCR alebo v izolovanej suspenzii DNA na základe oranžového farebného posunu. Vyškolení profesionálni používatelia laboratória by mali sledovať, či sa vyskytne zmena farby, a izoláciu DNA zopakovať, aby sa zabránilo akejkoľvek interferencii.

V prípade exogénnych interferentov EDTA, citrátu sodného, etanolu, kyseliny acetylsalicylovej, metoklopramidu a cyklosporínu sa nepreukázal žiadny interferenčný účinok pri ich príslušných C_{max} , pri ktorých bolo možné dosiahnuť meranie celého profilu DNA jedného genotypu XY1726, a odchýlky od neliečenej skupiny pozorované pri vzorkách zmiešaného chimérizmu meraných pri 2 %, 5 % a 30 % MC boli v medziach presnosti.

Pokiaľ ide o exogénne interferenty heparín, proteinázu K a metotrexát, interferencia sa pozorovala pri C_{max} odporúčanej v CLSI EP37 (1. vydanie). Ďalšie riedenia sa testovali dovtedy, kým sa nezistila žiadna interferencia. V prípade heparínu $2,36E-02$ mg/dl, proteinázy K $3,22E-06$ % v/v a metotrexátu 13,6 mg/dl sa nepreukázala žiadna interferencia.

Pomocou odporúčaných izolačných súprav sa dodatočne testovali krvné antikoagulanty EDTA, citrát sodný a heparín. Nebol zistený žiadny vplyv na analytický výkon. Očakávame, že pracovný postup izolačných súprav odstráni testované interferujúce látky pochádzajúce z antikoagulantov a činidiel na izoláciu DNA. Pokiaľ ide o chemoterapeutickú látku metotrexát, v porovnaní s referenčným blankom nevykazovala pri testovanej koncentrácii žiadne interferencie.

Tabuľka 14 testované koncentrácie endogénnych a exogénnych interferentov.

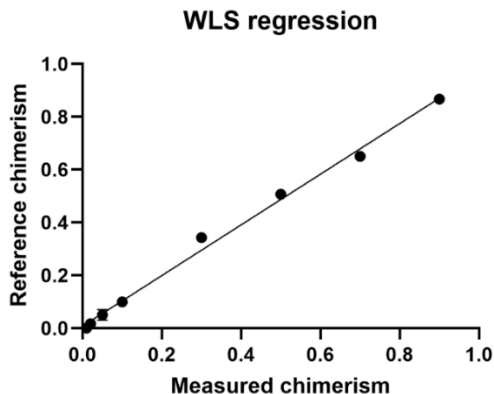
Typ interferentu	Kategória	Interferent	Koncentrácia bez rušivých vplyvov
Endogénne	Zložky plnej krvi	Plná krv	netestované
Exogénne	Antikoagulancia	EDTA	0.099 mg/dL
		Sodík, citrát	8.23E- 05 % v/v v PCR
		Heparín	2.36E- 02 mg/dL
	Činidlá na izoláciu DNA	Proteináza K	3.22E- 06 % v/v v reakcii PCR
		Etanol	2.70E- 03 % v/v v reakcii PCR
	Analgetiká a antipyretiká	Aspirín (kyselina acetylsalicylová)	3 mg/dL
	Antiemetikum	Metoklopramid	0.225 mg/dL
	Chemoterapeutikum	Metotrexát	13.6 mg/dL
	Imunosupresívna látka	Cyklosporín	0.18 mg/dL

Analytická citlivosť

Ľudská gDNA s jedným genotypom je merateľná v rozsahu od 0,125 ng do 2,00 ng. V tomto rozsahu sa dajú merať úplné profily všetkých markerov DIP a amelogenínu bez porúch. Odporúčame 1,00 ng ako optimálne vstupné množstvo DNA jedného genotypu pre prijateľnú celoprofilovú analýzu pri znížení spotreby materiálu. Na detekciu zmiešaného chimérizmu s optimálnou citlivosťou sme testovali rôzne vstupné množstvá. Aby sme sa vyhlí obmedzenej citlivosti pri nízkych vstupných množstvách, definovali sme 2,00 ng DNA ako optimálne vstupné množstvo na detekciu zmiešaného chimérizmu.

Linearita sa hodnotila na základe usmernenia CLSI - EP06Ed2 (2. vydanie). Linearita sa testovala pomocou šiestich rôznych zmiešaných vzoriek chimérizmu. Každá zmiešaná vzorka chimérizmu bola zriedená tak, aby

pokrývala chimérizmus príjemcu od 1 % do 90 % (1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 %). Prijateľná odchýlka od linearity (ADL) bola definovaná na 4 % pre vzorky do 10 % chimérizmu príjemcu, aby sa v tomto rozsahu umožnili len malé odchýlky. Pre chimérizmus príjemcu > 10 % bola ADL nastavená na 10 %, aby sa umožnili stredné odchýlky od linearity. Očakávané a predpokladané hodnoty boli pre všetky vzorky nižšie ako ADL, čo potvrdzuje linearitu testovaného rozsahu merania chimérizmu.



Obrázok 2 Príklad váženej regresie rôznych koncentrácií chimérizmu pre zmes chimérizmu 82+1180. Regresia ukázala koeficient determinácie 0,994, čo potvrdzuje vysoký stupeň linearity medzi nameranými a očakávanými hodnotami v celom rozsahu testu od 1 % do 90 % chimérizmu príjemcu.

Limit slepého pokusu (LoB) sa testoval na 31 DNA s jedným genotypom v troch rôznych dňoch s dvoma rôznymi sériami súpravy. LoB pre zmiešaný chimérizmus sa vypočítal pomocou neparametrického prístupu CLSI - EP17-A2 ($\alpha = 0,05$, 2. vydanie). Analyzovali sa len informatívne markery. Výsledok potvrdil hodnotu LOB 0,49 %.

Pri použití vstupného množstva 2,00 ng DNA sme testovali tri rôzne zmiešané vzorky chimérizmu s koncentraciami od 0,50 % do 3,00 %. Všetky vzorky boli testované s dvoma rôznymi sériami súpravy. Použitím Probit-analýzy (CLSI - EP17-A2, 2. vydanie) s úrovňou spoľahlivosti 95 % bol výsledný limit detekcie (LoD) pre šaržu 1 1,36 % a 1,39 % pre šaržu 3. Výsledná nahlasovaná hodnota LoD je 1,39 % zmiešaného chimérizmu.

Tabuľka 15 LoD pre Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit s použitím informatívnych markerov

Šarža	LoD (% zmiešaného chimérizmu)	N _{total}
Šarža 1	1,36 %	252
Šarža 3	1,39 %	252

Cieľ presnosti pre limit kvantifikácie bol definovaný podľa CLSI - EP17-A2 (2. vydanie). Pre detekciu chimérizmu na LoD sme definovali cieľ presnosti pomocou Westgardovho modelu ($TE = I_{bias} + 1,96 s$; (Westgard et al. 1974 [3])) a odchýlku a presnosť testu. Výsledná združená štandardná odchýlka 0,45 % bola nižšia ako cieľová presnosť 1,77 % na základe TE, čo potvrdzuje prijateľnú presnosť pri LoD.

Presnosť

Nepresnosť a skreslenie sa môžu líšiť medzi rôznymi obsahmi chimérizmu. Dospeli sme k záveru rozdeliť rozsah zmiešaného chimérizmu (MC) do troch intervalov, ktoré tiež uvádzajú Pettersson et al. (2021) [4] na stanovenie upravených kritérií prijateľnosti pre každý interval. Intervaly sú:

- Nízky MC s obsahom < 5 % druhého genotypu
- Stredný MC s obsahom 5 - 20 % druhého genotypu
- Vysoký MC s obsahom > 20 % druhého genotypu

Analýza presnosti vychádzala z usmernenia CLSI - EP21Ed2E(2. vydanie). Na výpočet hodnoty sigma na základe metriky Sigma sa použila odchýlka nameraná v porovnaní s referenčným materiálom a nepresnosť (reprodukovateľnosť) nameraná v štúdiu na viacerých miestach (Westgard et al. 2018 [3]). Prijateľná Total Error bola stanovená na základe odhadov skreslenia zo štúdie linearity a uvádzanej nepresnosti pre testy PCR na báze STR na analýzu chimérizmu (Pettersson et al. 2021 [4]). Výsledné hodnoty sigma vykazovali dobrú presnosť pre nízky a stredný interval MC a vynikajúcu presnosť pre vysoký interval MC.

Tabuľka 16 Sigma hodnoty pre zmiešaný chimérizmus

Vzorka	Sigma hodnota
2 % zmiešaný chimérizmus	3,08
5 % zmiešaný chimérizmus	3,05
30 % zmiešaný chimérizmus	4,99

Pravdivosť

Hodnotenie skreslenia bolo založené na referenčnom materiáli od troch rôznych poskytovateľov kruhových skúšok (3 rôzne programy External Quality Control). Skreslenie sa vypočítalo pre rozdiel medzi výsledkom Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a referenčnou hodnotou:

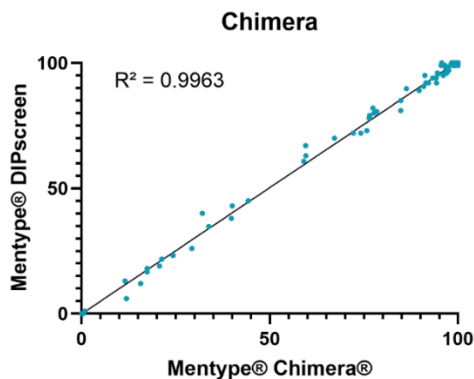
$$\Delta MC = \text{referenčný MC} - \text{Mentype DIPscreen MC}$$

Výpočet odchýlky vychádza z usmernenia CLSI - EP09Ed3cE (3. vydanie) a použil sa priemer hodnôt ΔMC , keďže bolo preukázané normálne rozdelenie (Shapiro-Wilkov test normality, $\alpha = 0,05$). Podľa referenčných hodnôt boli vzorky rozdelené do troch čiastkových intervalov pre MC, ako je opísané vyššie (kapitola Presnosť). Výsledná odchýlka sa pohybovala od -0,68 do 0,74.

Tabuľka 17 Skreslenie (priemer ΔMC) pre nízke, stredné a vysoké hodnoty MC

	nízka MC (< 5 %)	stredná MC (5 - 20 %)	vysoká MC (> 20 %)
Skreslenia (priemer ΔMC)	0,54	0,74	-0,68

Okrem hodnotenia skreslenia sme porovnali Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit s referenčnou metódou. Referenčná metóda založená na PCR Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit analyzuje polymorfizmus krátkych tandemových opakovaní (STR) na oddelenie dvoch jedincov (genotypov). Obe metódy sa merali na 97 vzorkách pacientov s rôznym obsahom zmiešaného chimérizmu. Výsledný koeficient determinácie 0,9963 potvrdil vysokú koreláciu medzi týmito dvoma metódami.



Obrázok 3 Porovnanie referenčnej metódy Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit. Lineárna regresia vpravo ukazuje prijateľnú koreláciu s koeficientom determinácie 0,9963.

Presnosť

Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť testu sme hodnotili na základe normy ISO 5725-2:2022-05 a CLSI - EP05 (3. vydanie). Zmiešané vzorky chimérizmu pokrývajúce rozsah merania chimérizmu (2 %, 5 %, 30 %, 70 %) boli hodnotené v štúdiu 5 x 5 x 3 (deň x opakovanie x miesto) na viacerých miestach. Výsledná opakovateľnosť pre zmiešaný chimérizmus sa pohybovala od 0,60 % do 1,68 % štandardnej odchýlky (SD) zmiešaného chimérizmu a reprodukovateľnosť od 0,63 % do 1,75 % SD zmiešaného chimérizmu.

Medzná hodnota testu

Vyhodnotili sme hraničnú hodnotu testu pre Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit na základe výpočtu alelickej frekvencie rôznych amplifikovaných markerov. Vzorky 81 jedincov boli analyzované pomocou Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Výsledné alelické frekvencie sa použili na výpočet špecifických forenzných diskriminačných parametrov, ktoré sú dôležité aj pre analýzu chimérizmu, ako je informačný obsah polymorfizmu (PIC), očakávaná heterozygotnosť (HET) a sila diskriminácie (PD), ktorá ukazuje schopnosť genetického markera alebo súboru markerov rozlišovať medzi rôznymi jedincami v rámci populácie. The PIC and HET

hodnoty ukazujú vysoko polymorfné INDELY a vysokú mieru heterozygotnosti pre Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. PD pre všetky markery DIP sa pohybuje od 0,5146 do 0,6581, čo technicky umožňuje rozlíšenie dvoch jedincov na základe aspoň jedného markera, ale PD sa zvyšuje pri použití viacerých markerov v kombinácii.

Tabuľka 18 Diskriminačná pravdepodobnosť všetkých markerov zahrnutých do Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. PIC, PD a HET boli vypočítané pre každý marker na základe analýzy 81 jedincov.

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

Marker	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

Stabilita pri používaní

Všetky štúdie stability boli naplánované v súlade s normou ISO 23640:2015 a usmernením CLSI EP25 (2. vydanie). Pri všetkých štúdiách stability sa postupovalo takto: Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit sa testovala vo viacerých časových bodoch počas rôzneho trvania. Analýza vzoriek chimérizmu sa vykonala pomocou ChimerisMonitor IVD, pričom príjemcu a darcu predstavovala DNA jedného genotypu XY1726 a XX1180.

Analyzovali sme DNA jedného genotypu XY1726 so vstupným množstvom DNA 1 ng a zmiešané vzorky chimérizmu (MC) XY1726:XX1180 (príjemca:darca) so vstupným množstvom DNA 1 ng, ktoré predstavujú rôzne intervaly MC 4 % a 30 % MC. Pre stabilitu hlavného mixu sme testovali rôzne intervaly MC 30 %, 5 % a 2 % s 1 ng vstupnej DNA pre 30 % a 5 % MC a 2 ng vstupnej DNA pre 2 % MC.

Konečné hodnotenie rôznych podmienok zahŕňalo porovnanie priemerov počiatočného časového bodu (t_0) a rôznych časových bodov (t_n) a vypočítalo sa pomocou nasledujúcej rovnice:

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

V rámci štúdie stability pri používaní sa vykonali tri experimenty. Jeden na testovanie stability po vystavení zmrazovacím a rozmrazovacím cyklom, jeden na testovanie stability po rôznom zaobchádzaní s hlavnou zmesou a druhý na testovanie stability súprav počas simulovaného používania po otvorení.

Všetky testované vzorky v experimente so stabilitou hlavnej zmesi vykazovali úplný profil markera pre jednogentypovú DNA XY1726 a boli pod celkovými limitmi presnosti a správnosti testu založenými na chybách pre tri testované vzorky MC: 30 %, 5 % a 2 % MC s limitmi 3,31 %, 3,62 % a 1,77 %. Preto Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit zostáva neovplyvnená rôznym zaobchádzaním s hlavnou zmesou.

Pokiaľ ide o stabilitu pri zmrazovaní a rozmrazovaní Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit nevykazuje žiadne kritické neprijateľné odchýlky od T_0 a úplný profil markera pre DNA XY1726 jedného genotypu a boli pod celkovými limitmi presnosti testu založenými na chybách pre testované vzorky MC: 30 % a 4 % s ich limitmi 3,31 % a 2,85 %. Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit je preto stabilná až 20 cyklov zmrazovania a rozmrazovania.

Na základe výsledkov simulovaného použitia po otvorení je Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit stabilná na použitie po prvom otvorení až 12 mesiacov, ako aj stabilná počas 20 zmrazovacích a rozmrazovacích cyklov.

Údaje o klinickej výkonnosti

Plán štúdie, etické a regulačné aspekty

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a referenčné metódy boli testované na vzorkách pacientov po alo-HSCT. Desať pacientov zahrnutých do tejto štúdie bolo monitorovaných po alo-HSCT a obsah vzoriek darcu počas monitorovania bol analyzovaný 10-krát po alo-HSCT. Cieľom tejto štúdie bolo poskytnúť klinické dôkazy podľa §§ 20 až 24 zákona o zdravotníckych pomôckach "Medizinproduktegesetz" (MPG verzia zo 7. augusta 2002 (BGBl. I S 3146). Pomocou cytogenetickej referenčnej metódy FISH sa musela preukázať zhoda s metódou PCR založenou na polymorfizme delécií a inzercii zariadenia. Potvrdenie zodpovednej etickej komisie bolo doručené 14.03.2012.

Referenčné metódy

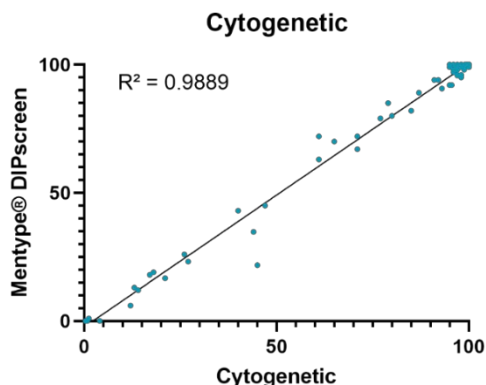
Ako referenčná metóda sa vykonala fluorescenčná hybridizácia na mieste (FISH) s použitím alozómovo špecifickej CE-IVD CEP® X SpectrumOrange™ / Y SpectrumGreen™ Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden). Na uplatnenie referenčnej metódy boli do štúdie zahrnuté len dvojice donor - príjemca rôzneho pohlavia. Podľa odporúčaní výrobcov sa hodnotili len cytogenetické výsledky s počtom buniek > 200.

Extrakcia a čistenie DNA

DNA bola izolovaná pomocou súpravy QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE). Izolácia sa vykonala podľa protokolu výrobcu.

Výsledky

Vysoká korelácia medzi Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a cytogenetickou referenčnou metódou s $R^2 = 0,9889$ potvrdzuje použiteľnosť na monitorovanie chimérizmu po alo-HSCT.



Obrázok 4 Korelácia cytogenetických a Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit výsledkov sú znázornené v grafe. Lineárna regresia vykazuje prijateľnú koreláciu s koeficientom determinácie 0,9889 (N = 87)

Výsledná zhoda 94,25 % (akceptovaných 5 % Δ MC) s výsledkami referenčnej metódy potvrdzuje spoľahlivosť Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit pre interpretáciu klinických údajov.

Diagnostické hodnotenie

Klinické charakteristiky výkonu ukázali prijateľné výsledky. Výsledky boli vyhodnotené s ohľadom na LoD PCR a cytogenetickú hodnotu 1 % (Bader et al. 2023 [5]). Parametre pre hodnotenie klinického výkonu podľa prílohy I odd. 9.1b IVDR sa zistilo, že nie je úplne použiteľný pre Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Zariadenie monitoruje skôr rozsah analytu ako jeho prítomnosť. Hodnotenie negatívneho a pozitívneho stavu analytu teda nie je úplne použiteľné.

Tabuľka 19 Diagnostické charakteristiky

Diagnostické charakteristiky	Odhad	Dolný konfidenčný interval	Horný konfidenčný interval
Diagnostická citlivosť	96,0 %	90,6 %	100,0 %
Diagnostická špecifickosť	76,3 %	62,8 %	89,8 %
Diagnostická presnosť	87,5 %	80,6 %	94,4 %
Pozitívna prediktívna hodnota	84,2 %	74,7 %	93,7 %
Negatívna prediktívna hodnota	93,5 %	84,9 %	100,0 %
Prevalencia	56,8 %	46,5 %	67,2 %

Kontrola kvality

Všetky komponenty súpravy prechádzajú intenzívnym procesom zabezpečenia kvality v BIOTYPE GmbH. Kvalita testovacej súpravy sa neustále monitoruje, aby sa zabezpečila neobmedzená použiteľnosť. Ak máte akékoľvek otázky týkajúce sa zabezpečenia kvality, kontaktujte nás.

Technická pomoc

V prípade potreby technického poradenstva sa obráťte na náš tím Customer Support:

e-mail: support@biotype.de

telefón: +49 (0)351 8838 400

Odkazy

[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

Obmedzenia používania

- Postupy uvedené v tomto IFU sa musia dodržiavať podľa popisu. Akékoľvek odchýlky môžu mať za následok zlyhanie testu alebo spôsobiť chybné výsledky.
- Používanie tohto výrobku je obmedzené na profesionálnych používateľov laboratória, ktorí sú špeciálne poučení a vyškolení v technikách PCR a kapilárnej gélovej elektroforéze.
- Na optimálne vykonanie tohto testu sú potrebné vhodné postupy odberu, prepravy, skladovania a spracovania vzoriek.
- Súprava bola validovaná len na použitie so vzorkami ľudskej periférnej žilovej krvi, ktoré sa používajú na PCR prístrojoch uvedených v kapitole Nástroje a softvér
- Tento test sa nesmie použiť priamo na vzorke. Pred použitím tohto testu je potrebné vykonať vhodné metódy extrakcie nukleových kyselín.
- Kontaminácia vzoriek DNA krvou zhoršuje výkonnosť produktu. Uistite sa, že počas extrakcie DNA nedochádza ku kontaminácii, a v prípade potreby Extrakcia DNA zopakujte.
- Súprava bola validovaná len s použitím súprav opísaných v kapitole Reagenty, súpravy a spotrebný materiál na extrakciu a čistenie DNA.
- Na zabezpečenie výkonu súpravy sa vyžaduje správna laboratórna prax.
- Výsledky sa musia interpretovať po konzultácii s klinickými lekármi, ktorí kombinujú výsledky analýz chimérizmu s výsledkami iných terapeuticky alebo diagnosticky relevantných metód.
- Interpretácia výsledkov musí zohľadňovať možnosť falošne negatívnych a falošne pozitívnych výsledkov.
- Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit nemožno použiť, ak sú darca a príjemca jednovaječné dvojčatá.
- Dvojité transplantácie neboli v rámci hodnotenia výkonnosti validované.

- Vzorka obsahujúca degradovanú DNA môže ovplyvniť schopnosť detekovať INDEL/DIP a lokusy špecifické pre pohlavie
- Nepoužívajte komponenty s vypršanou platnosťou alebo nesprávne uložené komponenty.
- Analýza chimérizmu bola validovaná pomocou informačných markerov špecifických pre pacienta (pre všetky rozsahy chimérizmu).
- Vzorky z rôznych etnických skupín môžu vykazovať odlišné genetické vlastnosti, ako sú napríklad rôzne alelické frekvencie, ktoré by mohli obmedziť rozlišovaciu schopnosť alebo amplifikáciu. Vyhodnotila sa alelická frekvencia niektorých markerov DIP vo viacerých populáciách. Kombinovaná rozlišovacia schopnosť je vysoká a jej hodnoty presahujú 0,99. To naznačuje relatívne nízke riziko, že test pacienta bude mať problémy s amplifikáciou. V súčasnosti sú však k dispozícii údaje o populácii kaukazského pôvodu. Potenciálny vplyv na ostatné etnické skupiny zatiaľ nie je možné odhadnúť.

Informácie o objednávaní

Objednávky zasielajte e-mailom na adresu sales@biotype.de.

Výrobok	Veľkosť balenia	Číslo objednávky
Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit	25 reakcií	45-12300-0025
	100 reakcií	45-12300-0100
Matrix Standard BT5 multi	1 x 25 µL	45-15100-0025
	2 x 25 µL	45-15100-0050
ChimerisMonitor IVD	demo licencia	46-14800-0000
	1-ročná licencia	
	3-ročná licencia	

POZNÁMKA



Jednotlivé komponenty súprav nie je možné objednať samostatne.

Ochranné známky a odmietnutie zodpovednosti

Mentype® a Chimera® sú registrované ochranné známky spoločnosti BIOTYPE GmbH.

Ďalšie ochranné známky: ABI PRISM®, GeneMapper®, GeneAmp® a Applied Biosystems® (Applied Biosystems LLC skupina); QIAamp® (Qiagen); POP-4™ (Európa: Applied Biosystems LLC, USA: Life Technologies Corporation).

Na PCR sa vzťahujú patenty. Patentoví zástupcovia sú Hoffmann-La Roche Inc. a F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Registrované názvy, ochranné známky atď. použité v tomto dokumente, aj keď nie sú výslovne označené ako také, nemožno považovať za nechránené zákonom.

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit je diagnostická súprava s označením CE podľa európskeho nariadenia o diagnostike in vitro (EÚ) 2017/746.

Výrobok nemá licenciu od Health Canada a nie je povolený ani schválený od FDA.

Zdravotnícka pomôcka nie je dostupná vo všetkých krajinách.

© 2025 BIOTYPE GmbH; všetky práva vyhradené.

Vysvetlenie symbolov



Výrobca



Kód dávky



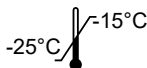
Obsahuje dostatočné množstvo činidiel pre <N> testov



Prečítajte si elektronický návod na použitie (eIFU)



Dátum spotreby



Teplotný limit



Katalógové číslo



Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro



Uchovávajte mimo dosahu slnečného svetla



Udržujte v suchu



Jedinečný identifikátor zariadenia

Ďalšie označenie použité v tomto návode na použitie:



Užitočné tipy



Pozor, dbajte na dodržiavanie tohto upozornenia!

[modro podčiarknutý text](#)

Odkazy vedúce na externý obsah, ako sú domovské stránky, e-mailové adresy

čierny podčiarknutý text

Krížové odkazy v dokumente na jednoduchú navigáciu

odsadené, kurzíva, tučný text

Polia, na ktoré sa má kliknúť v softvéri

Príloha

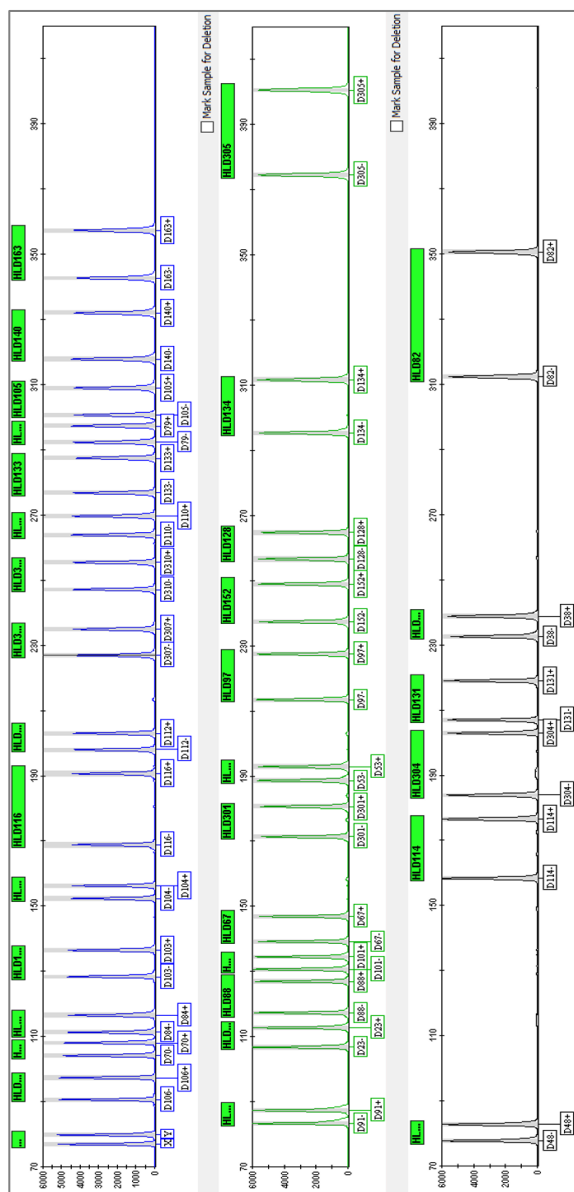
Elektroferogramy referenčných vzoriek

Na nasledujúcich stranách nájdete príklady elektroferogramov Mentype® DIPscreen Allelic Ladder (Obrázok 5), Control DNA XY82 (PC, Obrázok 6) a kontroly bez šablóny (NTC, Obrázok 7).

Všetky vzorky boli amplifikované na PCR cykléri ProFlex a analyzované na Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer (POP-4™, 36 cm array) s použitím validovaného parametra cyklu. Analýza údajov sa vykonala pomocou programu GeneMapper ID-X verzia 1.6. Použili sa šablóny Bins, Panels a Analysis Method podľa Tabuľka 12.

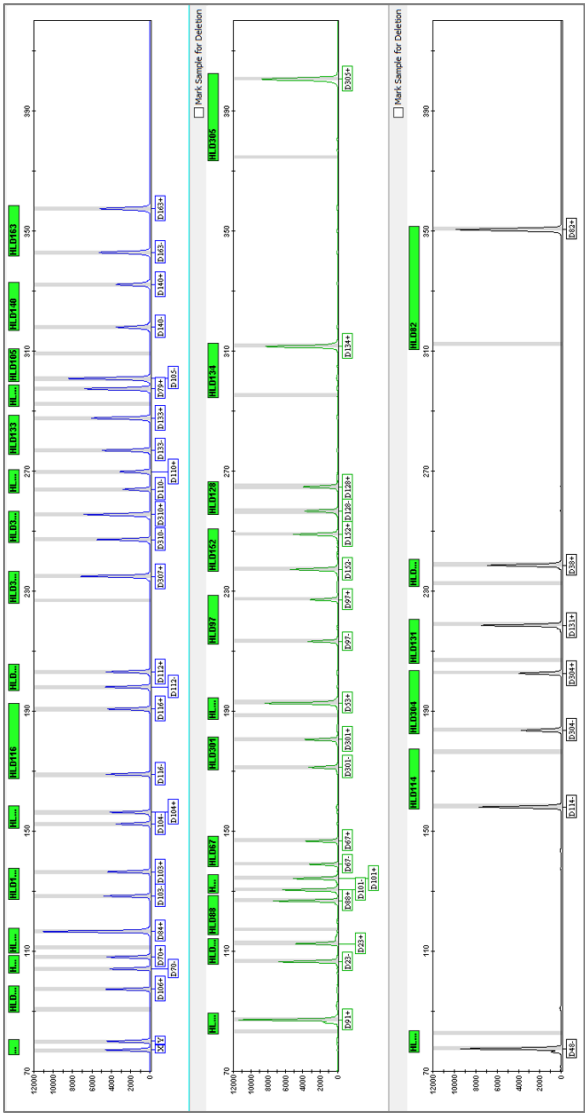
Elektroferogramy sú zväčšené na dĺžku fragmentu 70 - 420 bp (os x). Všeobecný rozsah pre analýzu dĺžky fragmentov (os x) pomocou Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit je 50 bp až 550 bp. Škálovanie osi y sa vykonalo individuálne podľa opisu pod každým obrázkom (Obrázok 5, Obrázok 6, Obrázok 7).

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder



Obrázok 5 Mentype® DIPscreen Allelic Ladder
Zväčšenie na 6 000 RFU (os y) a 70 - 420 bp (os x)

Control DNA XY82 (PC)



Obrázok 6 Control DNA XY82 (PC)
Zväčšenie na 12 000 RFU (os y) a 70 - 420 bp (os x)

Kontrola bez šablón (NTC)



Obrázok 7 Kontrola bez šablón (NTC)
Zväčšenie na 1 000 RFU (os y) a 70 - 420 bp (os x)

Dĺžky fragmentov a alel

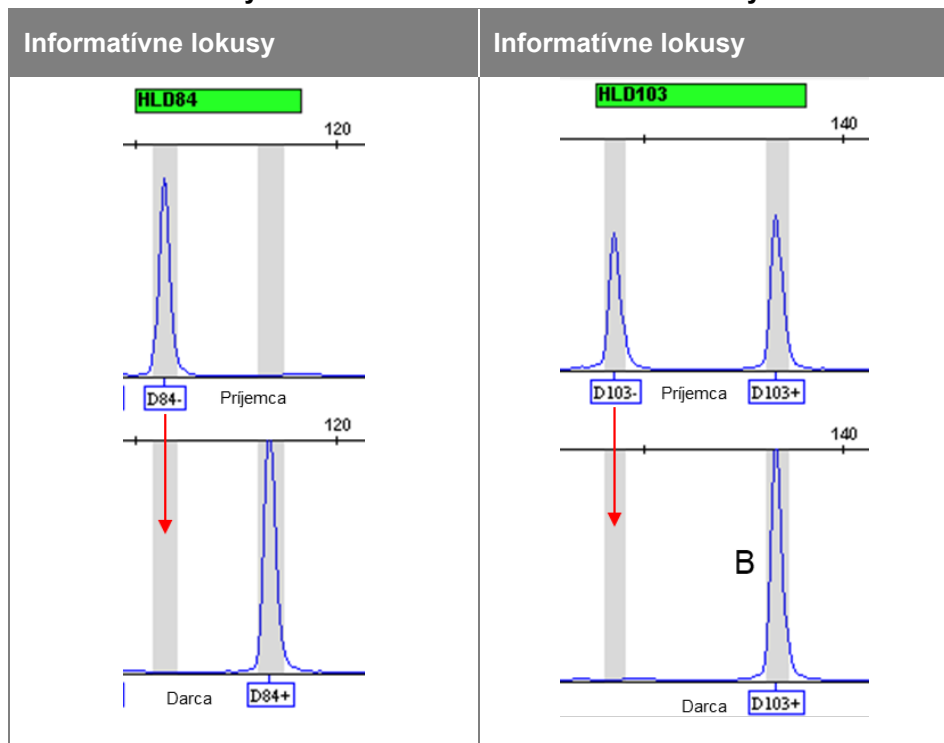
V Tabuľka 20 sú uvedené dĺžky fragmentov jednotlivých alel, ktoré sa vzťahujú na DNA Size Standard 550 (BTO). Všetky analýzy boli vykonané na ABI PRISM® 310/3130 Genetic Analyzer s POP-4™ polymérom. Rôzne analytické nástroje, štandardy veľkosti DNA alebo polyméry môžu viesť k rôznym dĺžkam fragmentov. Okrem toho sa odporúča vizuálne vyrovnanie s alelickým rebríčkikom.

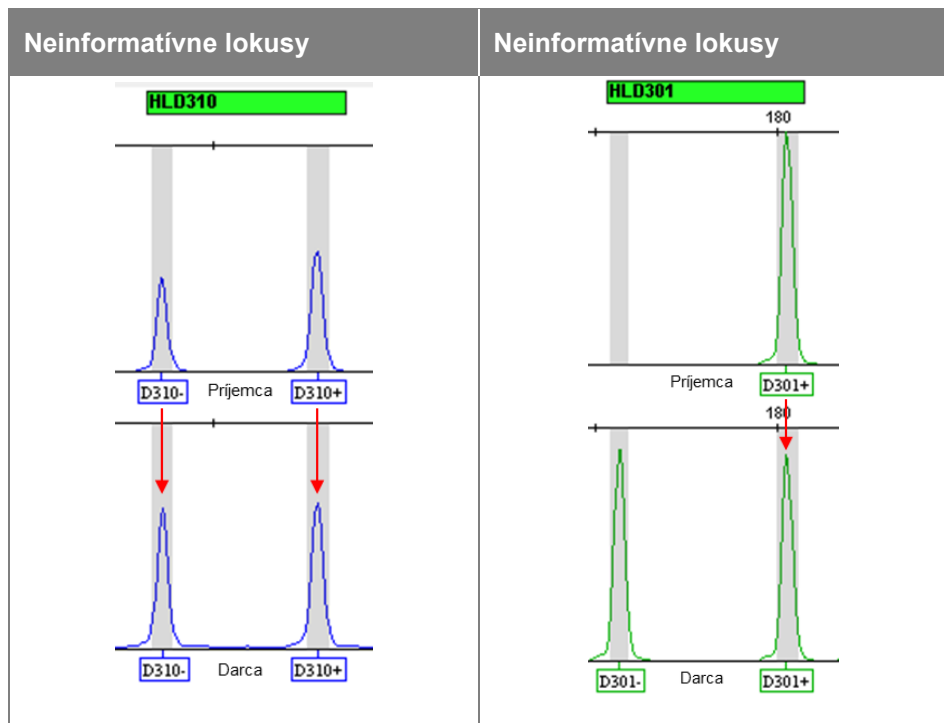
Tabuľka 20 Dĺžky fragmentov Mentype® DIPscreen Allelic Ladder analyzované na ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer s POP-4™ polymérom, * zaokrúhlené na celé číslo

Značka/ Modrý kanál	Veľkosť -DIP [bp]*	Veľkosť +DIP [bp]*	Značka/ Zelený kanál	Veľkosť -DIP [bp]*	Veľkosť +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	Značka/ Žltý kanál	Veľkosť -DIP [bp]*	Veľkosť +DIP [bp]*	
HLD105	302	310				
HLD140	318	333		HLD48	78	83
HLD163	344	358		HLD114	159	177
				HLD304	184	203
				HLD131	208	220
			HLD38	234	240	
			HLD82	314	352	

Príklady pre kvalitatívne hodnotenia lokov

Tabuľka 21 Príklady kvalitatívneho hodnotenia informatívnych lokusov



Tabuľka 22 Príklad kvalitatívneho hodnotenia neinformatívnych lokusov

BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Tel.: +49 351 8838 400

Fax: +49 351 8838 403

www.biotype.de

Objednávání

sales@biotype.de

Zákaznický servis a podpora

support@biotype.de

