

Mentype[®] DIPscreen

PCR Amplification Kit

Instructions d'utilisation (IFU)



0483

Pour diagnostic in vitro

DISIFU02v3fr

12.10.2026



45-12300-0025

45-12300-0100



Numéro de lot



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

Site web : www.biotype.de

E-mail : support@biotype.de

Commandes : sales@biotype.de



Avis de modification

Veillez noter les modifications suivantes par rapport à la version précédente de l'IFU:

Code du document	Modifications	Date
DISIFU02v1fr	Version initiale	09.07.2025
DISIFU02v2fr	Ajout concernant les interférences dans le chapitre Restrictions d'utilisation	10.09.2025
DISIFU02v3fr	Légère adaptation linguistique	12.10.2026

Une version imprimée de cette IFU peut être fournie gratuitement dans un délai de 7 jours.

Pour toute demande à ce sujet ou pour toute autre question, veuillez nous contacter:

au +49 351 8838 400 ou support@biotype.de

Sommaire

Utilisation prévue	4
Contexte scientifique	4
Description du produit	5
Matériel fourni	7
Contenu du kit	7
Description des composants	8
Conservation et manipulation des réactifs	9
Matériel et appareils requis mais non fournis	10
Équipement de laboratoire général	10
Réactifs, kits et consommables	11
Instruments et logiciels	11
Prélèvements et échantillons de test	13
Avertissements et précautions	13
Avis à l'utilisateur	14
Procédure	15
Aperçu du déroulement expérimental	15
Préparation des échantillons	16
Exigences relatives à l'échantillon brut	16
Extraction d'ADN	16
Quantification et dilution de l'ADN	17
Conservation de l'ADN	18
Préparation des témoins	18
Témoin positif PC	18
Témoin sans matrice NTC	19
Préparation du Mix PCR	19
Amplification PCR	21
Électrophorèse capillaire	22
Préparation des produits PCR	22

Analyse de longueur de fragment	24
Analyse des données	26
Procédure générale pour l'analyse des données	26
Validation de l'exécution du workflow	27
DNA Size Standard 550 (BTO).....	28
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder	28
Control DNA XY82 (PC)	29
No template control NTC	30
Analyse des échantillons.....	31
Workflow d'analyse des données	31
Analyse qualitative – identification des loci informatifs	31
Analyse semi-quantitative – analyse du chimérisme	32
Analyse des données avec ChimerisMonitor IVD	34
Analyse des données avec GeneMapper™ ID-X	36
Préparation du logiciel GeneMapper™ ID-X	36
Dépannage.....	40
Évaluation des performances.....	42
Données de performance clinique	52
Contrôle de qualité	55
Assistance technique	55
Références.....	55
Limites d'utilisation	56
Informations de commande.....	57
Marques et clauses de non-responsabilité	58
Explication des symboles.....	59
Annexe	61

Utilisation prévue

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit est un test réalisé manuellement destiné à être utilisé avec de l'ADN génomique extrait d'échantillons de sang total veineux périphérique prélevés chez des patients adultes atteints de leucémie ayant reçu une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques (allo-CSH).

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit détecte 33 polymorphismes d'insertion-délétion (DIP) et l'amélogénine en une seule réaction PCR multiplexe. Avant la HSCT, ces polymorphismes sont utilisés pour le dépistage qualitatif des génotypes du patient et du donneur et pour identifier les allèles DIP spécifiques du patient. Ces allèles informatifs sont analysés afin de réaliser un suivi semi-quantitatif du chimérisme après l'allo-CSH.

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit est destiné à des utilisateurs professionnels formés aux techniques de génétique moléculaire, à la PCR multiplexe et à la manipulation des analyseurs génétiques de Thermo Fisher Scientific (division Applied Biosystems).

Contexte scientifique

La transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques (allo-CSH) est une option thérapeutique permettant de guérir des patients atteints de maladies hématologiques malignes et non malignes, telles que la leucémie. L'analyse du chimérisme est utilisée pour déterminer la proportion de cellules hématopoïétiques du donneur et du receveur chez les patients ayant subi une allo-CSH, afin de détecter les signes précoces de rejet du greffon. Le sang veineux périphérique humain est utilisé pour le génotypage et le suivi. Selon les recommandations du CLSI (MM05-A2 2nd Edition) des anticoagulants tels que l'EDTA et le citrate sont recommandés pour le prélèvement sanguin. Selon l'évolution de la transplantation, différentes formes de chimérisme hématopoïétique (complet, mixte ou négatif) peuvent se développer. Différentes approches sont utilisées pour l'analyse du chimérisme, notamment l'hybridation in situ en fluorescence (FISH), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), l'analyse de la numération sanguine et les méthodes basées sur la PCR. L'analyse des polymorphismes d'insertion-délétion (INDEL ou DIP) permet une

analyse semi-quantitative du chimérisme grâce à des approches de PCR multiplexes, ainsi qu'une analyse quantitative avec des applications spécifiques d'allèles sur des plateformes qPCR ou dPCR. Par conséquent, de tels tests DIP sont indispensables pour un suivi sensible du chimérisme. Pour détecter les signes précoces de rejet du greffon, l'analyse du chimérisme doit être réalisée à intervalles réguliers et rapidement après l'allo-CSH.

Description du produit

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit est un kit d'amplification par réaction en chaîne par polymérase (PCR) multiplexe développé pour le suivi du chimérisme. Pour la discrimination donneur-receveur, des polymorphismes d'insertion-délétion bialléliques (INDEL ou DIPs) présentant un taux d'hétérozygotie très élevé et une distribution allélique équilibrée sur 19 chromosomes (voir [Tableau 1](#)) sont amplifiés simultanément en une seule réaction PCR. Chaque locus est marqué par une amorce couplée au fluorophore 6-FAM™, BTG ou BTY. Les produits PCR sont ensuite analysés par électrophorèse capillaire sur gel.

Tableau 1 Informations spécifiques au locus de Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, HLD = Locus humain DIP, -DIP = Délétion, +DIP = Insertion

Locus DIP	Position chromosomique	Locus DIP
Panel FAM		
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	-/AGGTGTGGAACAACATGATAC
HLD112	17p12	-/TTGTA
HLD307	Xp11.23	-/TCAACCAA
HLD310	2p22.3	-/GTCTGGTT
HLD110	16q22.1	-/TCCCTG
HLD133	3p22.1	-/CAACCTGGATT
HLD79	7q31.2	-/AATCT

Locus DIP	Position chromosomique	Locus DIP
HLD105	14q24.3	-/ATAGACAA
HLD140	3q23	-/GGTAGTATGGGCCT
HLD163	12q24.31	-/AACTACGGCAGCCCC
Panel BTG		
HLD91	11q14.1	-/GATA
HLD23	18p11.32	-/CTTTAA
HLD88	9q22.33	-/CCACAAAGA
HLD101	15q26.1	-/GTAG
HLD67	5q33.3	-/CTACTGAC
HLD301	17q21.32	-/CAGGGGCTC
HLD53	3q22.1	-/ATGT
HLD97	13q13.1	-/AGAGAAAGCTGAAG
HLD152	16p13.2	-/TGGTCAAAGGCA
HLD128	1q31.3	-/ATTAAATA
HLD134	5q11.2	-/ATGATGGTTCTTCAGA
HLD305	20q11.22	-
		/CAAGGTCCCACCACACTCGCGTGGGA
Panel BTY		
HLD48	2q11.2	-/GACTT
HLD114	17p13.2	-/TCCTATTCTACTCTGAAT
HLD304	9q34.3	-/GAGCTGCTCAAGAGAGAGG
HLD131	7q36.2	-/TTGGGCTTATT
HLD38	1q32.2	-/TAGTT
HLD82	7q21.3	-/ACCTCCTACTCCTTGGTCTATTCCTG
		GTCACATGTACT

Le test a été validé par l'analyse du chimérisme portant sur plus de 200 paires donneur-receveur apparentées et compatibles HLA, et son adéquation a été confirmée dans une étude d'évaluation clinique comparative.

La limite de détection pour l'analyse qualitative est de 125 pg d'ADN génomique.

La plage de quantité d'ADN en entrée pour la détection du chimérisme mixte dans des conditions standard est de 1,0 à 2,0 ng d'ADNg. La quantité optimale d'ADNg en entrée est de 2 ng dans des conditions standard.

Une sensibilité de 1,4 % LoD₉₅ (limite de détection) peut être atteinte en utilisant 2 ng d'ADNg en entrée, pour l'analyse des marqueurs informatifs. Pour atteindre la sensibilité mentionnée ci-dessus, il est recommandé d'utiliser autant de marqueurs informatifs que possible.

Matériel fourni

Contenu du kit

Tableau 2 Contenu du kit Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit

Réactif	Couleur du bouchon		Volume par taille de conditionnement	
			25 réactions	100 réactions
Nuclease-Free Water	Bleu clair		1.5 mL	2 x 1.5 mL
Reaction Mix A	Violet		125 µL	500 µL
Mentype® DIPscreen Primer Mix	Rouge		125 µL	500 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Blanc		15 µL	60 µL
Control DNA XY82 (2 ng/µL)	Blanc		10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Orange		13 µL	50 µL
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder	Vert		25 µL	25 µL

Un aperçu des numéros de lot des composants figure sur l'étiquette située à l'intérieur du rabat de la boîte.

REMARQUE

i

Veuillez noter que la taille de conditionnement indique le nombre de tests **sans** tenir compte du nombre de témoins requis ou de l'excédent nécessaire au pipetage.

Nous recommandons d'utiliser la taille suivante en fonction du débit correspondant :

- < 8 échantillons par run PCR : conditionnement de 25 réactions
- ≥ 8 échantillons par run PCR : conditionnement de 100 réactions

Description des composants

Nuclease-Free Water: eau de qualité PCR, utilisée lors de la préparation de la PCR et comme témoin sans matrice (NTC).

Reaction Mix A: tampon PCR contenant des dNTP et du $MgCl_2$. Le tampon PCR est optimisé pour favoriser l'activité enzymatique lors de la PCR.

Mentype® DIPscreen Primer Mix: mélange d'amorces oligonucléotidiques multiplexe contenant une amorce marquée (marquage: 6-FAM™, BTG, BTY) et des amorces non marquées.

Multi Taq 2 DNA Polymerase: polymérase Taq hot start, 2,5 U/μL.

Control DNA XY82 (2 ng/μL): ADN génomique isolé à partir de sang EDTA provenant d'un seul donneur masculin humain. Cet ADN doit être utilisé comme témoin positif externe qualitatif pour le Mentype® DIPscreen Amplification Kit.

REMARQUE



Le Control DNA XY82 ne présente pas de risque critique pour le professionnel de laboratoire, car il est constitué de molécules d'ADN purifiées, dépourvues de fonction biologique active. Il ne contient aucune cellule vivante ni organisme pathogène susceptible de représenter une menace directe.

DNA Size Standard 550 (BTO): mélange de fragments PCR marqués par fluorophore, présentant des longueurs de fragment définies comprises entre 60 et 550 pb; ce composant est ajouté à chaque produit PCR avant l'analyse de la longueur des fragments et il est utilisé pour une courbe de régression de taille permettant de déterminer précisément la longueur de fragment des produits PCR.

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder: mélange de produits PCR artificiels représentant tous les allèles détectés par le test, utilisé comme référence de génotypage pour l'identification exacte des allèles.

Conservation et manipulation des réactifs

Le kit est expédié sur carboglace. Les composants du kit doivent arriver congelés, à l'exception du Multi Taq 2 DNA Polymerase qui est conservé dans un tampon empêchant la congélation du réactif.

Veuillez vérifier l'intégralité du kit dès sa réception. N'utilisez pas de kits qui ont dégelé pendant le transport. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés, ou si les tubes ou l'emballage ont été endommagés pendant l'expédition, la performance ne peut être garantie.

Conserver tous les composants entre -25 °C et -15 °C, à l'abri de la lumière. En particulier, le Mentype® DIPscreen Primer Mix, DNA Size Standard 550 (BTO) et le Mentype® DIPscreen Allelic Ladder doivent être conservés à l'abri de la lumière.

Afin d'éviter toute contamination, nous recommandons que les composants de pré-amplification (échantillons d'ADN, le Control DNA XY82) et les composants de post-amplification (DNA Size Standard 550 (BTO) et Mentype® DIPscreen Allelic Ladder) soient conservés et utilisés séparément.

des réactifs PCR (Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A et Mentype® DIPscreen Primer Mix).

Le kit expire selon les informations indiquées sur l'étiquette de la boîte du kit ou 12 mois après ouverture, selon la première échéance atteinte. Ne pas dépasser un maximum de 20 cycles de congélation-décongélation.

Matériel et appareils requis mais non fournis

Équipement de laboratoire général

- Centrifugeuse paillasse équipée d'un rotor pour tubes de réaction de 2 mL et 200 µL
- Centrifugeuse équipée d'un rotor pour plaques de microtitration pour plaques de réaction à 96 puits
- Agitateur vortex
- Pipettes ajustables calibrées avec cônes filtrants anti-aérosols à usage unique
- Plaques de réaction à 96 puits de 200 µL appropriées ou tubes de réaction de 200 µL avec le matériel de fermeture correspondant, de qualité PCR
- Portoirs adaptés aux tubes de réaction de 2 mL et 200 µL
- Portoir réfrigérant adapté aux tubes de 2 mL
- Gants jetables non poudrés
- Spectrophotomètre NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific) ou Fluoromètre Qubit (Thermo Fisher Scientific)

REMARQUE



Tous les matériels utilisés pour la PCR doivent présenter une qualité appropriée (sans ADN et de qualité biologie moléculaire). Veuillez vous assurer que tous les instruments utilisés ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus conformément aux instructions et recommandations du fabricant.

Réactifs, kits et consommables

Tableau 3 Réactifs requis, mais non fournis

Réactif	Fournisseur	Numéro de commande
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

Instruments et logiciels

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a été validé pour être utilisé avec les thermocycleurs suivants:

- ProFlex PCR System (réf.: 4484073 (bloc échantillon 3 x 32 puits), 4484075 (bloc échantillon 96 puits), Thermo Fisher Scientific)
- GeneAmp® PCR System 9700 Silver (discontinué, réf. N805-0200, Thermo Fisher Scientific)
- Mastercycler nexus gradient (réf.: 6331000017, Eppendorf AG)
- Biometra Tadvanced (réf.: 846-2-070-214, Analytik Jena)

Un seul des instruments listés ci-dessus est nécessaire pour réaliser le test.

L'utilisation d'instruments autres que ceux mentionnés précédemment doit être validée par l'utilisateur. Les spécifications suivantes doivent être respectées:

- Couvercle chauffant
- Bloc adapté aux plaques/tubes de réaction de 200 µL
- Vitesse de rampe ajustable de 4 à 5 °C/s

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a été validé pour être utilisé avec l'instrument et les paramètres suivants:

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

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a été validé pour être utilisé avec les logiciels suivants. Un seul des logiciels listés ci-dessous est nécessaire pour analyser et évaluer les données. Une évaluation manuelle des fichiers fsa ou de tout résultat fourni par le logiciel de collecte de données, sans l'une des deux options logicielles décrites pour l'analyse et l'évaluation des données, n'est pas validée.

- ChimerisMonitor IVD, version 3.0.x (BIOTYPE GmbH)
- GeneMapper™ ID-X logiciel, version 1.6 (Thermo Fisher Scientific), en utilisant les éléments suivants spécifiques au produit:
 - Analysis Method: DIPscreenIVD_Analysis4_v1x ou DIPscreenIVD_Analysis7_v1x
 - Bin: DIPscreenIVD_Bins4_v1x ou DIPscreenIVD_Bins7_v1x
 - Panel: DIPscreenIVD_Panel4_v1x ou DIPscreenIVD_Panel7_v1x
 - Étalon de taille : BTO_60-550_v1x

REMARQUE



Veuillez vous assurer que tous les instruments utilisés ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus conformément aux instructions et recommandations du fabricant.

Prélèvements et échantillons de test

Les prélèvements suivants ont été validés avec le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit:

- ADN génomique isolé à partir de sang total veineux périphérique humain (EDTA, citrate, héparine) destiné à la surveillance et au génotypage.

L'ADNg isolé doit être conservé non dilué entre -25 °C et -15 °C.

REMARQUE



Veuillez vous assurer que l'anticoagulant utilisé pour le prélèvement sanguin est compatible avec les instructions du fabricant du kit d'extraction d'ADN.

Avertissements et précautions

- Lisez attentivement la notice d'utilisation avant d'utiliser le produit.
- Lisez les fiches de données de sécurité (FDS) et les déclarations de non-dangerosité (NHS) de tous les produits BIOTYPE, disponibles sur demande ou via notre page d'accueil (www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblätter). Pour les produits ne nécessitant pas de FDS car ils ne contiennent pas de SVHC ou sont soumis à d'autres restrictions du règlement 1272/2008 (CLP), BIOTYPE fournit la FDS sur demande.
- Veuillez contacter les fabricants des matériels et réactifs nécessaires mais non fournis pour obtenir des copies des FDS de tout réactif supplémentaire requis.

- Les composants de kits provenant de lots différents ne doivent pas être mélangés.
- Il est interdit de répartir les composants du kit dans d'autres récipients de réaction.
- L'utilisation de ce produit est réservée aux professionnels de laboratoire formés aux techniques de génétique moléculaire, à la PCR multiplex et à la manipulation des analyseurs génétiques de Thermo Fisher Scientific.
- Avant la première utilisation, vérifiez les points suivants concernant le produit et ses composants :
 - Intégrité
 - Exhaustivité en termes de nombre, de type et de remplissage (voir le chapitre Matériel fourni)
 - Étiquetage correct
 - État congelé à la réception (à l'exception du Multi Taq 2 DNA Polymerase)
- Les prélèvements doivent toujours être considérés comme infectieux et/ou présentant un risque biologique, conformément aux procédures de laboratoire sûres et aux bonnes pratiques de laboratoire.
- N'utilisez pas un kit dont la date d'expiration est dépassée.
- Éliminez les échantillons et les déchets d'analyse conformément à la réglementation locale en matière de sécurité.
- Tous les instruments utilisés ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus conformément aux instructions et recommandations du fabricant.

Avis à l'utilisateur

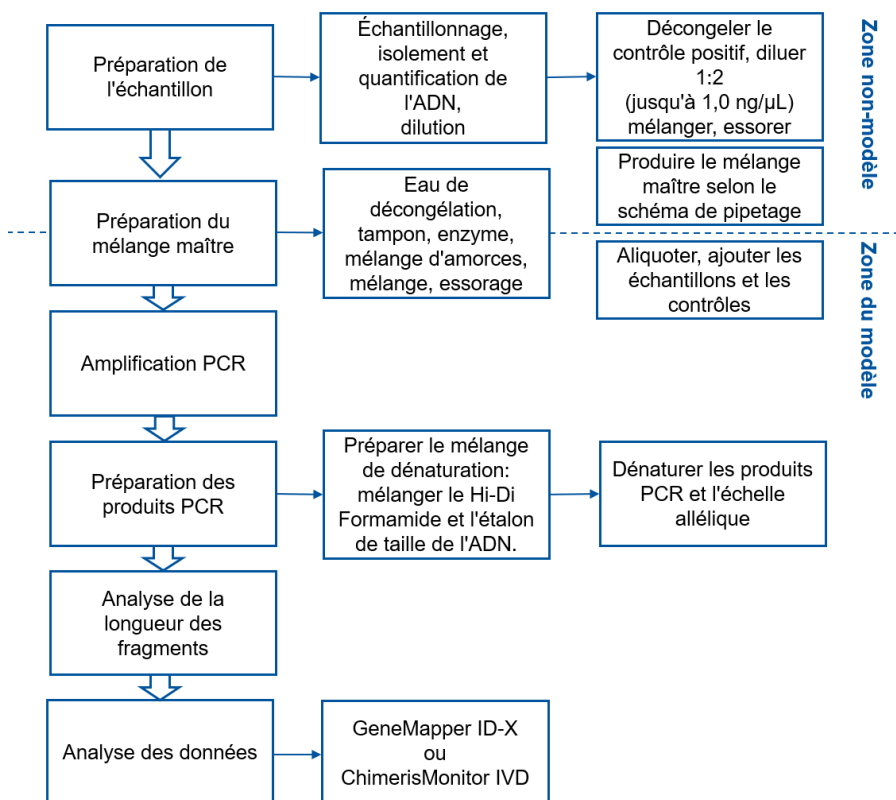
Tout problème survenant en rapport avec le produit doit être signalé par l'utilisateur au fabricant. Tout incident grave lié à ce kit doit être signalé au fabricant ainsi qu'à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

Un résumé des caractéristiques de sécurité et des performances (SSP) est établi conformément à l'article 29 du règlement (EU) 2017/746 et vise à donner un accès public, via la base de données EUDAMED, à une synthèse actualisée des données de sécurité et de performance du dispositif destinée

aux utilisateurs prévus, qui, pour ce produit, sont exclusivement des professionnels de laboratoire.

Procédure

Aperçu du déroulement expérimental



Préparation des échantillons

Exigences relatives à l'échantillon brut

Prélevez au moins 200 µL de sang total veineux périphérique pour la procédure suivante. La manipulation du matériel d'échantillon brut (sang total veineux périphérique) doit suivre la recommandation du guide Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline MM05–A2 (2^e édition), qui indique que le sang total peut être conservé à température ambiante (22 °C à 25 °C) pendant 24 heures maximum, ou entre 2 °C et 6 °C pendant 72 heures ou plus. Il est en outre recommandé d'utiliser l'EDTA, le citrate ou l'héparine comme anticoagulants pour le prélèvement de sang total.

REMARQUE



Un stockage prolongé du matériel d'échantillon brut peut entraîner une fragmentation du matériel génétique et, par conséquent, une qualité insuffisante du matériel. Cela peut détériorer le résultat de l'analyse, par exemple par des profils incomplets.

Extraction d'ADN

Effectuez l'extraction et la purification de l'ADN à partir d'échantillons de sang total veineux périphérique conformément aux instructions du fabricant. Les kits suivants ont été vérifiés dans le cadre de l'évaluation des performances du produit :

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit
- Macherey-Nagel NucleoSpin® Dx Blood, kit Mini certifié CE pour ADN à partir de sang

REMARQUE



Une contamination sanguine peut être détectée visuellement dans la réaction de PCR ou dans l'ADN isolé par un changement de couleur orange. Si un changement de couleur est observé, nous recommandons de répéter l'extraction d'ADN afin d'éviter toute interférence potentielle.

REMARQUE



Veillez à éliminer toute trace d'éthanol avant l'élution de l'acide nucléique. L'éthanol est un puissant inhibiteur de la PCR.

Quantification et dilution de l'ADN

Quantifiez la concentration d'ADN par spectroscopie UV/VIS à 260 nm à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop ou par spectroscopie de fluorescence à l'aide du fluoromètre Qubit™.

Lors de l'utilisation de la spectrophotométrie, utilisez le tampon d'élution du kit d'extraction d'ADN pour mesurer le blanc. Le rapport A_{260}/A_{280} doit être compris entre 1.7 et 1.9, tandis que le rapport A_{260}/A_{230} doit être compris entre 1.8 et 2.3.

Pour la quantification fluorométrique de l'ADN, le Qubit™ Fluorometer peut être utilisé avec soit le kit Qubit 1x dsDNA HS Assay--soit le kit Qubit dsDNA BR.

Pour une utilisation avec le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, diluez les échantillons d'ADN à une concentration optimale de 2.0 ng/μL. Préparez la dilution fraîchement avant utilisation. Utilisez de l'eau sans nucléase comme diluant.

REMARQUE



La plage de quantité d'ADN totale en pour le kit est de 0.125 à 2.0 ng d'ADN par réaction; **la quantité en entrée optimale est de 2 ng d'ADN** par réaction dans des conditions standard, pour une sensibilité maximale. Une quantité inférieure à 0.125 ng peut entraîner des profils incomplets ; une quantité plus élevée peut entraîner des pics de fuite

Conservation de l'ADN

L'ADN doit être conservé non dilué entre -25 °C et -15 °C pour un stockage à long terme, ou conformément aux informations du fabricant du kit d'extraction d'ADN.

Préparation des témoins

Témoin positif PC

Décongelez le Control DNA XY82, homogénéisez-le par vortex puis par une brève centrifugation.

Diluez le Control DNA XY82 au 1:2, de 2.0 ng/μL à 1.0 ng/μL, à l'aide de l'eau sans nucléase

Homogénéisez le PC dilué par un bref vortex. Ensuite, centrifugez brièvement le PC dilué (environ 10 s). Ne conservez pas le témoin positif dilué.

REMARQUE



Utilisez toujours une dilution fraîche du Control DNA XY82.

Témoin sans matrice NTC

Utilisez l'eau sans nucléase incluse dans le kit comme témoin sans matrice (NTC) à la place d'un échantillon.

Préparation du Mix PCR

Retirez les composants suivants du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit pour la préparation du Mix PCR:

- Nuclease-Free Water (bouchon bleu clair)
- Reaction Mix A (bouchon violet)
- Mentype® DIPscreen Primer Mix (bouchon rouge)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (bouchon blanc)

Tous les composants congelés doivent être décongelés à température ambiante (22 °C à 28 °C, environ 30 min, à l'abri de la lumière) et homogénéisés en inversant les tubes ou par un vortex doux. Ensuite, centrifugez brièvement les réactifs (environ 10 s). Pour respecter les principes des bonnes pratiques de laboratoire, il est conseillé de conserver le Multi Taq 2 DNA Polymerase dans un environnement réfrigéré aussi longtemps que possible (par ex. sur un support réfrigéré) avant la préparation du Mix PCR.

REMARQUE



Mélangez le Multi Taq 2 DNA Polymerase par tapotement pour une stabilité prolongée – **ne pas vortexer l'enzyme.**

Préparez le Mix PCR PCR conformément au Tableau 4 dans un tube de microcentrifugation de taille appropriée, pour le nombre total d'échantillons à tester, dans une zone propre dédiée. Incluez au moins un PC et un NTC dans votre calcul.

REMARQUE

En règle générale, si vous testez moins de 10 échantillons, prévoyez suffisamment de Mix PCR pour un échantillon supplémentaire. Si vous testez 10 échantillons ou plus, utilisez un volume excédentaire de Mix PCR de $\pm 10\%$.

Tableau 4 Préparation de la réaction du Mix PCR PCR *Le volume dépend de la concentration en ADN. Si un volume plus important d'ADN matrice est utilisé, veuillez à ajuster le volume de la Nuclease-Free Water. Le volume total de la réaction (rxn) doit toujours être de 25.0 μL .

Composant	Volume		
	1 rxn	5 rxn	10 rxn
Nuclease-Free Water*	13.4 μL	67.5 μL	134.0 μL
Reaction Mix A	5.0 μL	25.0 μL	50.0 μL
Mentype® DIPscreen Primer Mix	5.0 μL	25.0 μL	50.0 μL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	0.6 μL	2.4 μL	6.0 μL
ADN matrice ou échantillon témoin	1.0 μL *	5 x 1.0 μL *	10 x 1.0 μL *
Volume total	25.0 μL	125.0 μL	250.0 μL

Mélangez le Mix PCR par un vortex doux, puis centrifugez brièvement le mélange.

Répartissez 24.0 μL du Mix PCR PCR dans les tubes PCR de 200 μL préparés, puis centrifugez brièvement les tubes fermés.

Application des ADN matrices et des témoins

Ajoutez 1.0 μL des types d'échantillons suivants dans les tubes PCR préparés contenant le Mix PCR PCR.

NTC: ajoutez 1.0 μL de la Nuclease-Free Water à la place d'un échantillon.

Échantillon: ajoutez 1.0 μL des échantillons d'ADNg dilués préparés (2.0 ng/ μL).

PC: ajoutez 1.0 μL du Control DNA XY82 dilué au 1:2 préparé (1.0 ng/ μL), à la place d'un échantillon.

REMARQUE



Préparez d'abord le NTC afin d'éviter toute contamination du témoin. Préparez le PC en dernier afin d'éviter toute contamination croisée des échantillons.

REMARQUE



Utilisez au moins un témoin positif (PC) et un témoin sans matrice (NTC) par run. Sinon, le run ne peut pas être validé.

Fermez tous les tubes PCR, agitez doucement au vortex et centrifugez brièvement.

Amplification PCR

Programmez le thermocycleur avec le profil d'amplification suivant, en veillant à régler la rampe à 4 - 5 °C/s. Effectuez une PCR en « hot start » afin d'activer la polymérase et d'éviter la formation de produits d'amplification non spécifiques.

Tableau 5 Protocole PCR

Température	Durée	
94 °C	4 min	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	28 cycles
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	maintien

REMARQUE



Si des thermocycleurs à étapes de chauffage et de refroidissement réglables sont utilisés, **la rampe doit être réglée à 4 - 5 °C/s** afin d'assurer un équilibre optimal des signaux.

REMARQUE



Pour des informations de base concernant l'installation, la programmation et l'entretien des différents instruments de PCR, veuillez vous référer au manuel d'utilisation de l'instrument concerné.

REMARQUE



De très faibles quantités d'ADN peuvent entraîner des pertes alléliques statistiques et des déséquilibres des pics. L'augmentation du nombre de cycles de PCR accroît le risque de contamination croisée –due à des quantités minimales d'impuretés. De plus, des produits d'amplification non spécifiques peuvent apparaître.

Électrophorèse capillaire

Préparation des produits PCR

Une fois la PCR terminée, retirez les échantillons du thermocycleur et centrifugez-les brièvement.

REMARQUE



Une fois la PCR terminée, les produits PCR peuvent être conservés jusqu'à 4 semaines entre 2 °C et 8 °C, ou à long terme entre -25 °C et -15 °C, à l'abri de la lumière.

Décongelez, mélangez et centrifugez les réactifs :

- Hi-Di™ Formamide (non inclus dans le kit)
- Mentype® DIPscreen Allelic Ladder (bouchon vert)
- DNA Size Standard BTO (550) (bouchon orange)

Préparez le mélange de dénaturation décrit dans le [Tableau 6](#) et ajoutez une ou deux réactions pour compenser les variations de pipetage. Incluez une réaction supplémentaire pour l'échelle allélique.

Tableau 6 Mélange de dénaturation

Composant	Volume par réaction
Hi-Di™ Formamide	12.0 µL
DNA Size Standard BTO (550)	0.5 µL

Pipetez 12.0 µL du mélange de dénaturation dans les puits d'une plaque PCR (adaptée à l'utilisation dans l'analyseur génétique).

Ajoutez soit 1.0 µL de produit PCR, soit 1.0 µL de Mentype® DIPscreen Allelic Ladder dans les puits. Scellez la plaque PCR avec un film adapté, agitez au vortex et centrifugez brièvement la plaque.

REMARQUE



L'échelle allélique est utilisée pour déterminer correctement les fragments analysés lors de l'analyse des données. Dans chaque série d'analyse de longueur de fragment, l'échelle allélique doit être analysée au moins une fois pour garantir une évaluation correcte des données.

REMARQUE

Les capillaires de l'appareil d'électrophorèse sur gel ne doivent jamais fonctionner à sec. Si les échantillons n'occupent pas toutes les positions capillaires, remplissez les puits supplémentaires de la plaque avec 12.0 µL d' Hi-Di™ Formamide selon le nombre de capillaires.

Dénaturez les produits PCR préparés sur un thermocycleur pendant 3 minutes à 95 °C, puis refroidissez les échantillons à 4 °C dans le thermocycleur. Centrifugez brièvement les échantillons avant l'analyse de longueur de fragment.

Analyse de longueur de fragment

Avant d'effectuer la première analyse de longueur de fragment, effectuez le Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE GmbH) afin de réaliser un alignement spectral des colorants fluorescents utilisés pour le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit (6-FAM™, BTG, BTY, BTO).

REMARQUE

Reportez-vous à la notice d'utilisation du Matrix Standard BT5 multi pour son installation. Celle-ci est disponible sur www.biotype.de/en/ifus ou sur demande via support@biotype.de auprès de BIOTYPE GmbH.

Après l'exécution réussie du Matrix Standard BT5, importez les paramètres d'instrument fournis pour le 3500 Series Genetic Analyzer comme décrit dans le [Tableau 7](#) (www.biotype.de/en/template-files).

Tableau 7 Fichiers fournis pour les analyseurs génétiques (www.biotype.de/en/template-files)

3500 Series Genetic Analyzers

Protocole d'instrument	POP-4™, 36 cm capillary array: DIPscreenIVD_Instrument436.xml POP-7™, 50 cm capillary array:
------------------------	--

3500 Series Genetic Analyzers	
	DIPscreenIVD_Instrument750.xml
Protocole d'étalon de taille	BTO_60-550_SizeStandard.xml
Protocole de détermination de la taille	BTO_60-550_Sizecalling.xml
Essai	POP-4™, 36 cm capillary array: DIPscreenIVD_Assay436.xml POP-7™, 50 cm capillary array: DIPscreenIVD_Assay750.xml

Les spécifications du protocole d'instrument requis sont décrites dans le Tableau 8. Seuls les paramètres décrits doivent être ajustés; les autres paramètres doivent rester au réglage par défaut. Suivez les instructions d'utilisation du fabricant pour définir les paramètres d'exécution spécifiques.

Tableau 8 Paramètres des modules de run pour les différents appareils d'électrophorèse capillaire sur gel

	Tension d'injection [kV]	Durée d'injection [s]	Tension de run [kV]	Durée du run [s]
3500 Series Genetic Analyzer	3.0	8	Réseau de capillaires de 36 cm : 15	1560
			Réseau de capillaires de 50 cm : 19.5	

Contrairement aux valeurs indiquées dans le Tableau 8, la durée du run peut être ajustée en fonction de la longueur du réseau de capillaires utilisé, mais il est obligatoire d'analyser tous les fragments (60 – 550 bp) du DNA Size Standard 550 (BTO).

Pour configurer un protocole d'étalon de taille, les tailles suivantes pour le DNA Size Standard 550 (BTO) doivent être attribuées au panel orange :

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, et 550 bp.

REMARQUE

BIOTYPE GmbH fournit des modèles spécifiques pour l'installation simplifiée des paramètres de run spécifiques pour l'analyse de longueur de fragment, ainsi que des modèles d'analyse pour une configuration logicielle simple de GeneMapper™ ID-X. Ces modèles sont disponibles au téléchargement via: www.biotype.de/en/template-files.

Analyse des données

Procédure générale pour l'analyse des données

1. Vérifier la validité de l'exécution

- Voir le chapitre **Validation de l'exécution du flux de travail**



2. Vérifier la validité de l'échantillon

- Voir le chapitre **Analyse d'échantillons**



3. Évaluation des échantillons

- Voir le chapitre **Analyse qualitative - identification des loci informatifs**
- Voir le chapitre **Analyse semi-quantitative - analyse du chimérisme**

REMARQUE

L'analyse des données doit être effectuée soit avec le logiciel ChimerisMonitor IVD soit avec le logiciel GeneMapper™ ID-X (Thermo Fisher Scientific). Une évaluation manuelle des fichiers fsa ou de tout résultat fourni par le logiciel de collecte de données, sans l'une des deux options logicielles décrites pour l'analyse et l'évaluation des données, n'est pas validée.

Validation de l'exécution du workflow

1. Échelle allélique
valide

- Valide DNA Size Standard 550 (BTO)
- Hauteur de pic valide ≥ 200 RFU
- Tous les pics attendus sont présents



2. Contrôle positif
valide PC

- Valide DNA Size Standard 550 (BTO)
- Hauteur de pic valide ≥ 200 RFU
- Tous les pics attendus sont présents



3. Contrôle valide de
l'absence de gabarit
NTC

- Valide DNA Size Standard 550 (BTO)
- Pas de pics ≥ 200 RFU détectés

REMARQUE

La plage de mesure de 50 à 560 bp doit être analysée pour évaluer la validité.

DNA Size Standard 550 (BTO)

La détermination des longueurs exactes des produits amplifiés dépend du type d'appareil, des conditions d'électrophorèse ainsi que de l'étalon de taille d'ADN utilisé. En raison de la complexité de certains loci, la détermination de la taille doit s'appuyer sur des références régulièrement réparties.

Vérifiez le DNA Size Standard 550 (BTO) dans tous les échantillons selon les critères suivants :

- Presence of all fragments at: **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, et 550 bp**
- Tous les fragments sont présents avec des hauteurs de pic supérieures **ou égales à 50 RFU**
- Coefficient de détermination **$R^2 > 0.995$** .
- Les fragments ne diminuent pas de manière continue en hauteur de pic avec l'augmentation de la longueur de fragment.

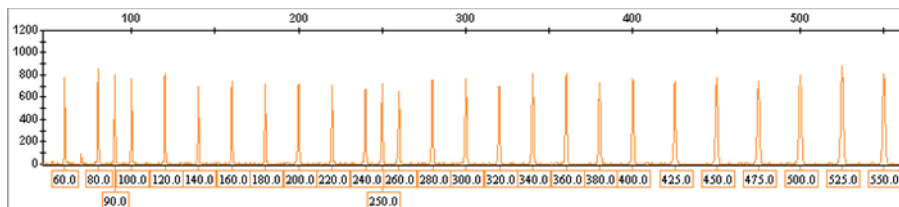


Figure 1 Électrophérogramme du DNA Size Standard 550 (BTO), fragments dont les longueurs sont exprimées en bp

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder

Après avoir vérifié la validité de l'étalon de taille, vérifiez que tous les pics disponibles dans l'échelle allélique sont présents avec des hauteurs de pic supérieures au seuil **≥ 200 RFU**.

REMARQUE



Le Mentype® DIPscreen Allelic Ladder comprend des fragments pour chaque allèle détectable. Veuillez comparer les allèles avec l'annexe Tableau 20 et la Figure 5.

Control DNA XY82 (PC)

Après avoir vérifié la validité de l'étalon de taille, assurez-vous qu'un profil ADN complet de tous les pics spécifiques du PC est présent avec des hauteurs de pic **supérieures ou égales à 200 RFU** (voir Tableau 9). Le Control DNA XY82 est un témoin PCR qualitatif permettant de garantir la performance générale du Mix PCR.

Le Control DNA XY82 (voir annexe Figure 6), qui fait partie du kit de test, représente les allèles suivants:

Tableau 9 Génotype du Control DNA XY82, - = Délétion, + = Insertion

Locus	Control DNA XY82	Locus	Control DNA XY82
Panel FAM (canal bleu)		Panel BTG (canal vert)	
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	+/+	Panel BTY (canal jaune)	
HLD105	-/-	HLD48	-/-

Locus	Control DNA XY82	Locus	Control DNA XY82
HLD140	-/+	HLD114	-/-
HLD163	-/+	HLD304	-/+
		HLD131	+/+
		HLD38	+/+
		HLD82	+/+

No template control NTC

Après avoir vérifié la validité de l'étalon de taille, vérifiez qu'aucun pic supérieur **ou égal à 200 RFU** n'est détecté dans la plage de bin du NTC (voir annexe [Figure 6](#)).

REMARQUE



En utilisant ChimerisMonitor IVD ou GeneMapper™ ID-X avec les fichiers modèles fournis pour l'Analysis Method, les pics < 200 RFU ne reçoivent pas automatiquement de nom d'allèle, ce qui facilite l'évaluation des résultats.

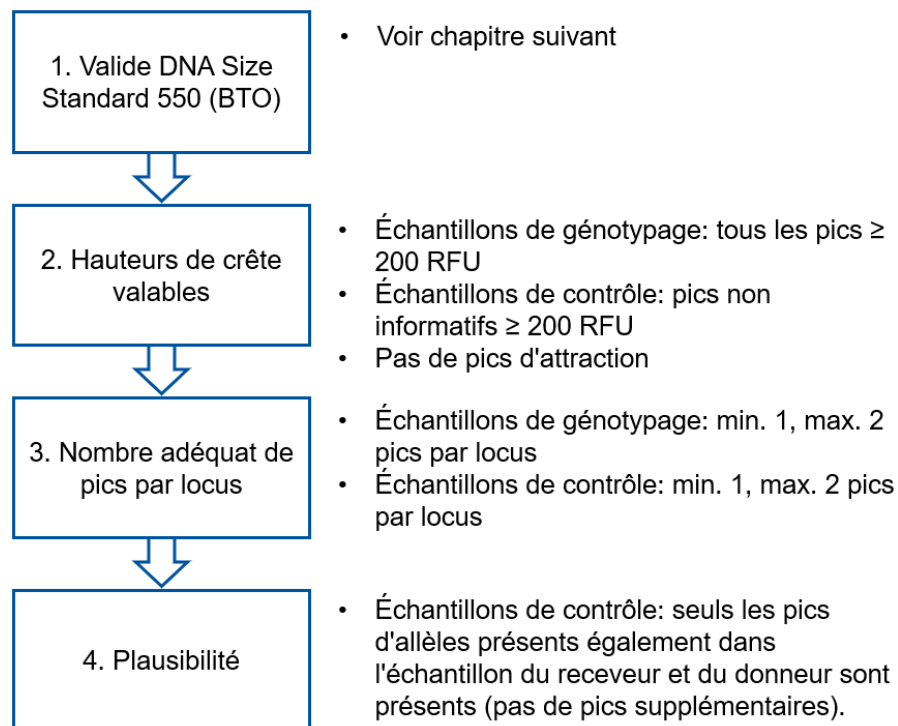
REMARQUE



Des artefacts tels que de petites taches de colorant peuvent apparaître de manière plus marquée dans le NTC. En raison de la base de pic large, de la forme de pic anormale et de l'absence d'attribution de pic, une différenciation par rapport aux pics d'amplicon est possible.

Analyse des échantillons

Workflow d'analyse des données



En utilisant le logiciel ChimerisMonitor IVD, les étapes de validation décrites pour le run et les échantillons sont mises en œuvre automatiquement.

En utilisant le logiciel GeneMapper™ ID-X avec les modèles spécifiques fournis par BIOTYPE GmbH, la validation de base est effectuée automatiquement.

Analyse qualitative – identification des loci informatifs

La section suivante explique l'identification et la différenciation des loci spécifiques du receveur. Les loci spécifiques du donneur sont donc définis comme non informatifs. L'identification des loci informatifs est réalisée à

l'aide des données du receveur et du donneur avant la transplantation. Pour des exemples, voir le [Tableau 21](#) au [Tableau 22](#) en annexe.

En utilisant ChimerisMonitor IVD, l'identification des loci informatifs est prise en charge par le logiciel.

Loci informatifs: un allèle de l'échantillon du receveur ne peut pas être détecté dans l'échantillon du donneur.

Loci non informatifs: loci pour lesquels le(s) pic(s) spécifique(s) au receveur se superpose(nt) au(x) pic(s) spécifique(s) au donneur, ou loci spécifiques au donneur.

Analyse semi-quantitative – analyse du chimérisme

L'analyse semi-quantitative du chimérisme est réalisée comme décrit dans la littérature, par ex. Clark et al. (2015) [1] ou Nollet et al. (2001) [2]. Les formules de quantification dépendent de la combinaison allélique du locus et sont présentées dans le [Tableau 10](#) suivant (adapté de Clark et al.). La valeur de chimérisme est calculée pour chaque locus informatif précédemment sélectionné. La moyenne de toutes les valeurs de chimérisme spécifiques aux loci est ensuite calculée.

REMARQUE



L'évaluation de chaque valeur de SD_{Marqueur} est recommandée afin d'identifier les valeurs aberrantes. La valeur de SD_{Marqueur} pour les échantillons à faible chimérisme mixte ($< 5\%$ MC) ne doit pas dépasser 4 %. Pour un chimérisme mixte moyen à élevé ($> 5\%$ MC), la valeur de SD_{Marqueur} ne doit pas dépasser 10 %. Si la valeur de SD_{Marqueur} dépasse les limites, il est recommandé de réanalyser les valeurs de MC des marqueurs choisis afin de rechercher des valeurs aberrantes.

Tableau 10 Analyse semi-quantitative du chimérisme (adapté de Clark et al. [1])

Scénario 1	Scénario 2
aucun allèle partagé : le receveur est homozygote, le donneur est homozygote, aucun pic n'est partagé	un allèle partagé (homozygote) : le receveur est hétérozygote, le donneur est homozygote, un pic est partagé
Ratio du receveur : $\% \text{ chimérisme} = \frac{A}{A+B} \times 100 \%$	Ratio du receveur : $\% \text{ chimérisme} = \frac{A}{\left(\frac{B-A}{2}\right) + A} \times 100\%$

Analyse des données avec ChimerisMonitor IVD

ChimerisMonitor IVD est un logiciel avancé pour l'analyse automatisée des données, l'évaluation des runs et le calcul du chimérisme. Le système intégré de **Gestion des patients (Patient Management)** permet de suivre la cinétique du chimérisme dans des rapports haute résolution, ainsi que dans des graphiques et une visualisation sous forme de tableaux.

Pour des instructions générales sur l'analyse des échantillons, reportez-vous à la notice d'utilisation du logiciel ChimerisMonitor IVD.

Tous les modèles d'analyse requis sont inclus dans le système de **Gestion des kits de test (Test Kit Management)** de ChimerisMonitor. Ceux-ci contiennent des méthodes d'analyse ainsi que des modèles de Bin et de Panel liés. Le logiciel effectue une évaluation générale et intégrée du run lors de l'importation du batch, conformément au chapitre Validation de l'exécution du workflow. Voir le Tableau 11 pour une description générale du workflow d'analyse des données de ChimerisMonitor.

REMARQUE

i

L'analyse des données doit être réalisée soit avec le logiciel ChimerisMonitor IVD, soit avec le logiciel GeneMapper™ ID-X (Thermo Fisher Scientific). Une évaluation manuelle des fichiers fsa ou de tout résultat obtenu avec le logiciel de collecte de données, sans l'un des deux logiciels décrits pour l'analyse et l'évaluation des données, n'est pas validée.

Tableau 11 Flux de travail de l'analyse de chimérisme avec ChimerisMonitor

N°	Icon e	Étape de travail
1		Importation des échantillons
		Créer un nouveau patient (Create new patient). Une base de données de tous les patients créés est représentée dans la Gestion des patients (Patient Management)
		Import par lots (Batch Import): - Sélectionnez le kit de test Biotype Mentype DIPscreen. Tous les seuils pour l'évaluation correcte de la run

N°	Icône	Étape de travail
		et des échantillons sont liés à la méthode d'analyse respective. - Importer une ~~run~~ série contenant les fichiers fsa de l'échelle allélique, du témoin positif, du témoin sans matrice et des échantillons. - Sélectionner manuellement les types d'échantillons (essentiel pour une attribution correcte des pics et un calcul robuste du chimérisme) - L'évaluation générale de la run et des échantillons est effectuée par le logiciel  Ouvrir la Vue d'import par lots (Batch Import View)  Attribuer un échantillon (Assign Sample): Sélectionner un échantillon et l'attribuer au patient
2		Vérifier les témoins – ChimerisMonitor effectue une évaluation intégrée de la qualité ainsi qu'une évaluation de la run et des échantillons Vérifier l'Électrophérogramme de l'échelle allélique (Allelic Ladder Electropherogram) et la Régression de calibration de taille (Size Calling Regression)  Les avertissements de qualité possibles sont affichés : - Dans l'onglet Évaluation des échelles alléliques (Evaluation of Allelic Ladders) pendant l'import par lots (Batch Import) - Dans l'onglet Avertissements d'import FSA (FSA Import Warnings) de l'éditeur de patient (Patient Editor) Vérifier l'Électrophérogramme du témoin positif (Positive Control Electropherogram) et la Régression de calibration de taille (Size Calling Regression)  L'Évaluation du témoin positif et du témoin sans matrice (Evaluation of Positive and No Template Controls) pendant l'import par lots (Batch Import) affiche les avertissements de qualité possibles. Vérifier l'Électrophérogramme du témoin sans matrice (No Template Control Electropherogram) et la Régression de calibration de taille (Size Calling Regression)  L'Évaluation du témoin positif et du témoin sans matrice (Evaluation of Positive and No Template Controls) pendant l'import par lots (Batch Import) affiche les avertissements de qualité possibles
3		Évaluation des échantillons

N°	Icone	Étape de travail
		Vérifier l' Électrophérogramme de l'échantillon (Sample Electropherogram) . Une attribution correcte des pics est essentielle pour une définition précise des marqueurs informatifs et un calcul robuste du chimérisme. Le Contrôle de la qualité de l'échantillon (Sample Quality) pendant l'import par lots (Batch Import) affiche les avertissements de qualité possibles
		Vérifier la Régression de calibration de taille (Size Calling Regression) de l'échantillon Le Contrôle de la qualité de l'échantillon (Sample Quality) pendant l'import par lots (Batch Import) affiche les avertissements de qualité possibles
4		Définition des marqueurs informatifs
		Créer une nouvelle transplantation (Create a new transplantation) : des marqueurs prédéfinis peuvent être sélectionnés pour le suivi du patient
5		Analyse de chimérisme
		Calculer le chimérisme (Calculate Chimerism) : Voir les marqueurs présélectionnés pour l'analyse de chimérisme et effectuer le calcul du chimérisme (chimérisme par marqueur unique, chimérisme total et écart type)
6		Rapport
		Créer un rapport (Create Report) : Les valeurs individuelles et la cinétique du chimérisme sont affichées au fil du temps (tableau et graphique, format de fichier pdf ou csv)
7		Construire un système piloté par base de données pour la Gestion des patients (Patient Management)

Analyse des données avec GeneMapper™ ID-X

Préparation du logiciel GeneMapper™ ID-X

Pour des instructions générales sur l'utilisation et l'analyse des échantillons avec ce logiciel, veuillez consulter le manuel d'utilisation du logiciel GeneMapper™ ID-X.

L'attribution des allèles doit être effectuée avec le logiciel d'analyse GeneMapper™ ID-X en combinaison avec les fichiers modèles du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit de BIOTYPE GmbH. Les fichiers modèles

BIOTYPE (voir [Tableau 12](#)) sont disponibles sur notre page d'accueil (www.biotype.de/en/template-files) en téléchargement, ou sur demande via support@biotype.de. Le flux de travail de l'analyse de chimérisme utilisant le logiciel GeneMapper™ ID-X est présenté dans le [Tableau 13](#).

Tableau 12 Modèles BIOTYPE GmbH pour le logiciel GeneMapper™ ID-X, modèles spécifiques à l'application # POP-4™ ou § POP-7™

Modèle	Nom du modèle	
Panels*	DIPscreenIVD_Panel4_v1x DIPscreenIVD_Panel7_v1x	ou versions ultérieures
Bin Sets*	DIPscreenIVD_Bins4_v1x DIPscreenIVD_Bins7_v1x	ou versions ultérieures
Étalon de taille*	BTO_60-550_v1x	ou versions ultérieures
Analysis Method*	DIPscreenIVD_Analysis4_v1x DIPscreenIVD_Analysis7_v1x	ou versions ultérieures
Paramètres des tracés	PlotsBT5_4dyes	
Paramètres du tableau	Tableau pour 2 allèles Tableau pour 10 allèles	

*Ces modèles doivent toujours être utilisés pour l'analyse des données. Les autres fichiers modèles sont facultatifs.

REMARQUE

i

L'import et l'attribution des allèles avec les fichiers modèles fournis ne sont garantis que si le logiciel GeneMapper™ ID-X est utilisé. Lorsque le logiciel GeneMapper™ est utilisé, vous pouvez rencontrer des problèmes d'import avec certains fichiers modèles. Il peut être nécessaire d'ajuster les panels et les bins avec une ou plusieurs runs de l'échelle allélique sur la configuration spécifique de votre instrument. Contactez-nous pour obtenir de l'aide (support@biotype.de).

Tableau 13 Flux de travail de l'analyse de chimérisme avec GeneMapper™ ID-X

N°	Icône	Étape de travail										
1		Préparation du logiciel										
		Gestionnaire de panels (Panel Manager) Importer les fichiers modèles fournis pour Panel, Bins										
		Gestionnaire GeneMapper™ ID-X (GeneMapper™ ID-X Manager) Importer le modèle fourni pour Analysis Method et Étalon de taille										
2		Importation des échantillons										
		Ajouter des échantillons au projet (Add Samples to Project) - parcourez pour trouver le dossier de la run, sélectionnez, puis Ajouter à la liste (Add to List) Ajouter (Add)										
3		Analyse des échantillons										
		Sélectionnez les propriétés suivantes dans les colonnes appropriées de la feuille d'échantillons, puis choisissez Analyser (Analyze) .										
		<table><tr><th>Nom de la colonne</th><th>Sélectionner</th></tr><tr><td>Type d'échantillon</td><td>Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control or Sample</td></tr><tr><td>Analysis Method</td><td>Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé DIPscreenIVD_Analysis_v1x</td></tr><tr><td>Panel</td><td>Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé DIPscreenIVD_Panel_v1x</td></tr><tr><td>Étalon de taille</td><td>Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé BTO_60-550_v1x</td></tr></table>	Nom de la colonne	Sélectionner	Type d'échantillon	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control or Sample	Analysis Method	Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé DIPscreenIVD_Analysis_v1x	Panel	Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé DIPscreenIVD_Panel_v1x	Étalon de taille	Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé BTO_60-550_v1x
Nom de la colonne	Sélectionner											
Type d'échantillon	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control or Sample											
Analysis Method	Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé DIPscreenIVD_Analysis_v1x											
Panel	Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé DIPscreenIVD_Panel_v1x											
Étalon de taille	Sélectionnez le modèle BIOTYPE GmbH précédemment importé BTO_60-550_v1x											
4		Vérifier les témoins										
		Vérifier la validité des témoins (échelle allélique, témoin positif, témoin sans matrice)										
		Si les hauteurs de pics sont suffisantes, l'attribution est effectuée conformément aux spécifications de la méthode d'analyse (Analysis Method)										
5		Évaluation des échantillons										

N°	Icône	Étape de travail
		Vérifier la validité de l'échantillon.
		Si les hauteurs de pics sont suffisantes, l'attribution est effectuée conformément aux spécifications de la méthode d'analyse
		Si des pics ne sont pas attribués bien que des hauteurs suffisantes soient atteintes, une attribution manuelle est possible. Veuillez vérifier la plausibilité de toutes les attributions de pics.
6		Définition des marqueurs informatifs
		Comparer les génotypes du receveur et du donneur, puis identifier manuellement les marqueurs informatifs (voir Annexe, Exemples d'évaluation qualitative des locii)
7		Analyse de chimérisme
		Exporter le Tableau de dimensionnement (Sizing Table) et calculer les valeurs de chimérisme selon le Tableau 10 - voir le chapitre Analyse semi-quantitative – analyse du chimérisme

REMARQUE

i

En utilisant les fichiers modèles fournis pour l'Analysis Method, les Bins, les Panels, et en sélectionnant le type d'échantillon correspondant, la validité de ces échantillons est vérifiée automatiquement par le logiciel. Les indicateurs de contrôle qualité SOS (Sample off-Scale), SQ (Sizing Quality), OMR (Outside Marker Range) doivent être des cases vertes pour une validité réussie.

ARNM	SOS	SQ	SSPK	MIX	OMR	CGQ
						

REMARQUE

Utiliser l'éditeur de correspondance de taille (Size Match Editor) du logiciel GeneMapper™ ID-X pour évaluer l'étalon de taille. Si l'attribution automatique des fragments a échoué, les triplets 80 / 90 / 100 bp et 240 / 250 / 260 bp peuvent être utilisés comme repères pour l'attribution manuelle des pics.

Dépannage

L'analyse post-PCR et l'attribution automatique des allèles avec un logiciel d'analyse adapté garantissent une discrimination précise et fiable des allèles.

Un calcul automatisé du ratio d'ADN donneur/receveur, ainsi que des écarts types et des limites de détection, peut être obtenu directement à partir des données brutes d'une analyse de la taille des fragments.

Si les résultats obtenus avec le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit doivent être harmonisés avec les résultats des analyses cytologiques, assurez-vous que les analyses cytologiques ont été réalisées avec au moins 200 leucocytes.

Pics de pull-up

Des pics de fuite peuvent apparaître si les hauteurs de pics sont en dehors de la plage de détection linéaire, ou si une matrice incorrecte a été appliquée. Ils peuvent apparaître aux positions de pics spécifiques dans d'autres panels de couleur, généralement avec des intensités de signal plus faibles. En cas d'observation régulière, veuillez envisager de répéter la génération de la matrice et de vérifier une éventuelle surcharge d'ADN.

Ajout de nucléotides indépendant du modèle

En raison de son activité de transférase terminale, la Multi Taq 2 DNA Polymerase tend à ajouter un radical adénosine à l'extrémité 3' des fragments d'ADN amplifiés. Le pic artéfactuel est plus court d'une base que prévu (pics -1 pb). Toutes les amorces BIOTYPE sont conçues pour minimiser ces artéfacts. La formation d'artéfacts est encore réduite par l'étape finale d'extension du protocole PCR à 68 °C pendant 60 min. La

hauteur du pic artéfactuel est corrélée à la quantité d'ADN. Les laboratoires doivent définir leurs propres limites individuelles pour l'analyse de ces pics.

Artéfacts

La température ambiante peut influencer la performance des produits PCR sur les instruments multi-capillaires, et des pics en épaule ou des pics dédoublés peuvent apparaître. En outre, l'attribution automatique peut, dans certains cas, être influencée. Si ces effets se produisent, nous recommandons de réinjecter l'échantillon à une température ambiante plus élevée et, éventuellement, d'utiliser plus d'un échantillon d'échelle allélique par run.

Des artéfacts tels que de petites taches de colorant peuvent également apparaître dans les échantillons, et de manière encore plus marquée dans le NTC. En raison de la base de pic large, de la forme anormale du pic et de l'absence d'attribution de pic, une différenciation par rapport aux pics d'amplicons est possible.

Écarts de pipetage

L'analyse de robustesse du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a montré que le kit est robuste face à des écarts mineurs par rapport au protocole décrit (+/- 10 % d'écart). Un écart moyen (+/- 20 %) par rapport au protocole expérimental décrit peut être plus critique pour l'analyse du chimérisme mixte (en particulier à de faibles pourcentages de chimérisme). Il est essentiel de prêter une attention particulière au tampon PCR Reaction Mix A. Un écart de -20 % dans ce tampon peut entraîner une réduction significative de la hauteur du signal, voire des marqueurs indétectables. Pour minimiser tout écart, nous recommandons d'utiliser des pipettes calibrées, un pipetage précis et un mélange minutieux.

Valeurs aberrantes

L'évaluation de l'écart type au sein des marqueurs (SD_{Marqueur}) est recommandée pour identifier les valeurs aberrantes. Si le SD_{Marqueur} pour les échantillons à faible chimérisme mixte (< 5 % MC) dépasse 4 % et pour les échantillons à chimérisme mixte moyen à élevé (> 5 % MC) 10 %, veuillez envisager de réanalyser les valeurs de MC sans cette valeur aberrante spécifique.

Influence des polymères

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a été validé et certifié pour l'analyse sur les polymères POP-4™ et POP-7™.

Lors de l'utilisation du polymère POP-7™, des taches de colorant peuvent apparaître dans la partie initiale des électrophérogrammes. En particulier, des taches de colorant ont été observées jusqu'à une taille de 110 pb dans le canal bleu et peuvent affecter le locus HLD106. Vérifiez les électrophérogrammes pour de tels effets avant d'effectuer l'analyse de chimérisme.

L'utilisation d'autres polymères (par ex. POP-6™) peut influencer le comportement de migration de produits PCR spécifiques. En outre, le bruit de fond peut augmenter en raison du comportement différent des colorants fluorescents libres.

Évaluation des performances

Spécificité analytique

Nous avons testé l'attribution automatique des allèles avec l'échelle allélique ainsi que la concordance de l'attribution des allèles par rapport au pré-typage des ADN de test au moyen d'autres méthodes (autres kits PCR) en utilisant le logiciel Genemapper™ ID-X.

Nous avons évalué quatre-vingt-un échantillons d'ADN pré-caractérisés, analysés à l'aide du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Des profils complets avec des hauteurs de pics ≥ 200 RFU ont été détectés. Après détermination des paramètres spécifiques à l'appareil pour le test, le génotype correct a été attribué à tous les échantillons d'ADN pour tous les systèmes DIP et le marqueur amelogenin. De plus, nous avons évalué la spécificité des amorces du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Aucun produit PCR non spécifique dû à un mauvais amorçage n'a été observé, assurant ainsi la spécificité des amorces du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit.

Interférents et réactions croisées

Les interférents potentiels susceptibles d'influencer les résultats de la procédure de mesure ont été évalués conformément aux recommandations des lignes directrices CLSI EP07 (3^e édition), EP37 (1^{re} édition). Pour le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, les interférents endogènes et exogènes ont été déterminés, leur concentration maximale attendue ($C_{\max}$) dans la réaction PCR telle que suggérée dans les lignes directrices a été testée et, en cas d'interférence observée, des concentrations supplémentaires ont été testées afin de déterminer la concentration à laquelle aucune interférence n'est détectable.

Les résultats ont montré un effet interférent de l'interférent endogène sang testé à 2.57E 003 % v/v dans la réaction PCR sur la mesure du profil complet de l'ADN à génotype unique. De plus, des écarts par rapport au groupe non traité ont été observés pour les échantillons de chimérisme mixte mesurés à 2 %, 5 % et 30 % MC. Les résultats étaient hors des limites d'exactitude et ont donc montré une interférence sur la réaction PCR. Cependant, la contamination sanguine peut être détectée visuellement dans la réaction PCR ou dans la suspension d'ADN isolé par un changement de couleur orange. Les professionnels de laboratoire formés doivent observer si un changement de couleur est présent et répéter l'isolement de l'ADN pour éviter toute interférence.

Pour les interférents exogènes EDTA, citrate de sodium, éthanol, acide acétylsalicylique, métoclopramide et ciclosporine, aucun effet interférent n'a été observé à leur $C_{\max}$ respective, où la mesure du profil complet de l'ADN à génotype unique DNA XY1726 a pu être obtenue, et les écarts par rapport au groupe non traité observés pour les échantillons de chimérisme mixte mesurés à 2 %, 5 % et 30 % MC étaient dans les limites d'exactitude.

Pour les interférents exogènes héparine, protéinase K et méthotrexate, une interférence a été observée à la $C_{\max}$ recommandée par CLSI EP37 (1^{re} édition). D'autres dilutions ont été testées jusqu'à ce qu'aucune interférence ne soit détectable. Pour l'héparine, 2.36E- 002 mg/dL, pour la protéinase K, 3.22E-006 % v/v, et pour le méthotrexate, 13.6 mg/dL n'ont montré aucune interférence.

Les anticoagulants sanguins EDTA, citrate de sodium et héparine ont également été testés avec les kits d'isolement recommandés. Aucun impact

sur la performance analytique n'a été détecté. Nous nous attendons à ce que le flux de travail des kits d'isolement élimine les substances interférentes testées provenant des anticoagulants et des réactifs d'isolement de l'ADN. Quant à l'agent chimiothérapeutique méthotrexate, il n'a montré aucune interférence à la concentration testée par rapport à son blanc de référence.

Le Tableau 14 présente les concentrations testées des interférents endogènes et exogènes

Type d'interfèrent	Catégorie	Interfèrent	Concentration non interférente
Endogène	Composants du sang total	Sang total	non testé
Exogène	Anticoagulants	EDTA	0.099 mg/dL
		Citrate de sodium	8.23E-005 8,23 x 10 ⁻⁶ % v/v dans la PCR
		Héparine	2.36E-02 2,36 x 10 ⁻² mg/dL
	Agents d'isolement de l'ADN	Protéinase K	3.22E-006 3,22 x 10 ⁻⁶ % v/v dans la réaction PCR
		Éthanol	2.70E-003 2,70 x 10 ⁻³ % v/v dans la réaction PCR
	Analgsésiques et antipyrétiques	Aspirine (acide acétylsalicylique)	3 mg/dL
	Agent antiémétique	Métoclopramide	0.225 mg/dL
	Agent chimiothérapeutique	Méthotrexate	13.6 mg/dL
	Agent immunosuppresseur	Ciclosporine	0.18 mg/dL

Sensibilité analytique

L'ADN génomique humain à génotype unique est mesurable dans une plage de 0.125 ng à 2.00 ng. Dans cette plage, des profils complets de tous les

marqueurs DIP et de l'amelogenin peuvent être mesurés sans défauts. Nous recommandons 1.00 ng comme quantité d'entrée optimale d'ADN à génotype unique pour une analyse de profil complet acceptable tout en réduisant la consommation de matériel. Pour la détection du chimérisme mixte avec une sensibilité optimale, nous avons testé différentes quantités d'entrée. Pour éviter une sensibilité restreinte pour de faibles quantités d'entrée, nous avons défini 2.00 ng d'ADN comme quantité d'entrée optimale pour la détection du chimérisme mixte.

La linéarité a été évaluée sur la base de la ligne directrice CLSI - EP06Ed2 (2e édition). La linéarité a été testée en utilisant six échantillons de chimérisme mixte différents. Chaque échantillon de chimérisme mixte a été dilué pour couvrir le chimérisme du receveur de 1 % à 90 % (1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 %). L'écart acceptable par rapport à la linéarité (ADL) a été défini à 4 % pour les échantillons jusqu'à 10 % de chimérisme du receveur afin de n'autoriser que des écarts mineurs dans cette plage. Pour un chimérisme du receveur > 10 %, l'ADL a été fixé à 10 % afin de permettre des écarts moyens par rapport à la linéarité. Les valeurs attendues et prédites étaient inférieures à l'ADL pour tous les échantillons, confirmant la linéarité pour la plage de mesure du chimérisme testée.

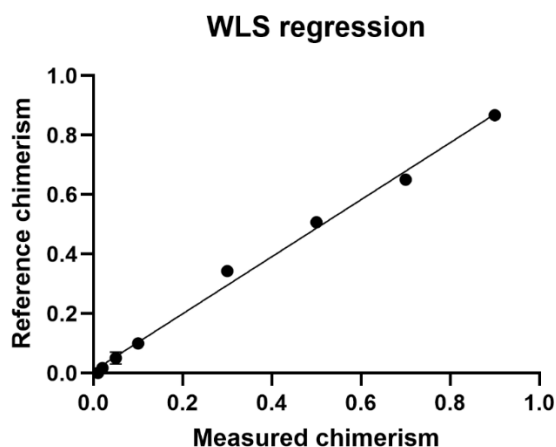


Figure 2 Exemple de régression pondérée de différentes concentrations de chimérisme pour un mélange de chimérisme donné. La régression a montré un coefficient de détermination de 0.994,

confirmant un degré élevé de linéarité entre les valeurs mesurées et les valeurs théoriques

La limite de blanc (LoB) a été testée sur 31 ADN à génotype unique, sur trois jours différents avec deux lots de kit différents. La LoB pour le chimérisme mixte a été calculée en utilisant l'approche non paramétrique de CLSI - EP17-A2 ($\alpha = 0.05$, 2^e édition). Seuls les marqueurs informatifs ont été analysés. Le résultat a confirmé une LOB de 0.49 %.

En utilisant une quantité d'entrée d'ADN de 2.00 ng, nous avons testé trois échantillons de chimérisme mixte différents avec des concentrations de 0.50 % à 3.00 %. Tous les échantillons ont été testés avec deux lots de kit différents. En utilisant l'analyse Probit (CLSI - EP17-A2, 2^e édition) avec un niveau de confiance de 95 %, la limite de détection (LoD) résultante pour le Lot 1 était de 1.36 % et de 1.39 % pour le Lot 3. La LoD rapportable résultante est de 1.39 % de chimérisme mixte.

Tableau 15 LoD pour le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit en utilisant les marqueurs informatifs

Lot	LoD (% de chimérisme mixte)	N _{total}
Lot 1	1.36 %	252
Lot 3	1.39 %	252

L'objectif de précision pour la limite de quantification a été défini conformément à CLSI - EP17-A2 (2^e édition). Pour la détection du chimérisme à la LoD, nous avons défini l'objectif de précision en utilisant le modèle de Westgard ($TE = |biais| + 1.96 s$; (Westgard et al. 1974 [3])) ainsi que le biais et la précision du test. L'écart type mis en commun résultant, de 0.45 %, était inférieur à l'objectif de précision basé sur le TE de 1.77 %, confirmant une exactitude acceptable à la LoD.

Exactitude

L'imprécision et le biais peuvent varier entre différents niveaux de chimérisme. Nous avons conclu de diviser la plage de chimérisme mixte (MC) en trois intervalles, également rapportés par Pettersson et al. (2021)

[4], afin d'établir des critères d'acceptation adaptés pour chaque intervalle. Les intervalles sont :

- MC faible avec < 5 % de contenu du second génotype
- MC moyen avec 5 - 20 % de contenu du second génotype
- MC élevé avec > 20 % de contenu du second génotype

L'analyse de l'exactitude a été basée sur la ligne directrice CLSI – EP21Ed2E (2^e édition). Le biais mesuré par rapport au matériau de référence et l'imprécision (reproductibilité) mesurée dans une étude multisite ont été utilisés pour calculer une valeur sigma basée sur la métrique Sigma (Westgard et al. 2018 [3]). L'erreur totale acceptable a été établie sur la base des estimations de biais de l'étude de linéarité et de l'imprécision rapportée pour les tests PCR basés sur les STR pour l'analyse de chimérisme (Pettersson et al. 2021 [4]). Les valeurs sigma résultantes ont montré une bonne exactitude pour les intervalles de MC faible et moyen, et une excellente exactitude pour l'intervalle de MC élevé.

Tableau 16 Valeurs sigma pour le chimérisme mixte

Échantillon	Valeur sigma
2 % de chimérisme mixte	3.08
5 % de chimérisme mixte	3.05
30 % de chimérisme mixte	4.99

Justesse

Outre l'évaluation du biais, nous avons comparé le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit à un matériau de référence issu de trois fournisseurs d'essais interlaboratoires différents (3 programmes de contrôle qualité externe différents). Le biais a été calculé pour la différence entre le résultat du

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

Le calcul du biais est basé sur la ligne directrice CLSI - EP09Ed3cE (3^e édition) et a utilisé la moyenne des valeurs ΔMC , la distribution normale ayant été démontrée (test de normalité de Shapiro-Wilk, $\alpha = 0.05$). Selon les

valeurs de référence, les échantillons ont été répartis dans les trois sous-intervalles de MC décrits ci-dessus (chapitre Exactitude). Le biais résultant variait de -0.68 à 0.74.

Tableau 17 Biais (moyenne de Δ MC) pour un MC faible, moyen et élevé

	MC faible (< 5 %)	MC moyen (5-20 %)	MC élevé (> 20 %)
Biais (moyenne de Δ MC)	0.54	0.74	-0.68

Outre l'évaluation du biais, nous avons comparé le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit à une méthode de référence. La méthode de référence du Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit, basée sur la PCR, analyse le polymorphisme des répétitions courtes en tandem (STR) pour distinguer deux individus (génotypes). Les deux méthodes ont été mesurées sur 97 échantillons de patients représentant différents niveaux de chimérisme mixte. Le coefficient de détermination résultant de 0.9963 a confirmé une corrélation élevée entre les deux méthodes.

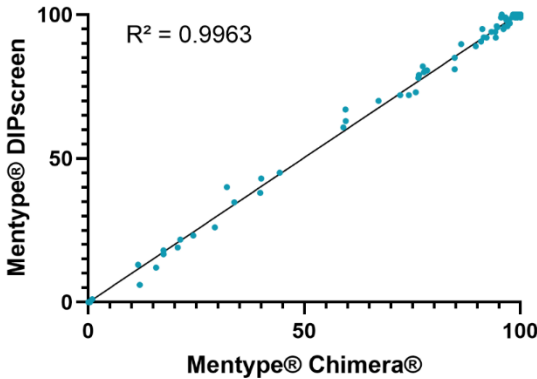


Figure 3 Comparaison de la méthode de référence entre le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit et le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit. La régression linéaire à droite montre une corrélation acceptable avec un coefficient de détermination de 0.9963

Précision

Nous avons évalué la répétabilité et la reproductibilité du test sur la base de la norme ISO 5725-2:2022-05 et de la ligne directrice CLSI - EP05 (3^e édition). Des échantillons de chimérisme mixte couvrant la plage de mesure du chimérisme (2 %, 5 %, 30 %, 70 %) ont été évalués dans une étude multisite 5 x 5 x 3 (jour x réplicat x site). La répétabilité résultante pour le chimérisme mixte variait entre 0.60 % et 1.68 % d'écart type (SD) du chimérisme mixte, et la reproductibilité variait entre 0.63 % et 1.75 % de SD du chimérisme mixte.

Seuil du dosage

Nous avons évalué le seuil du dosage pour le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit en se basant sur le calcul de la fréquence allélique des différents marqueurs amplifiés. Des échantillons de 81 individus ont été analysés avec le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Les fréquences alléliques résultantes ont été utilisées pour calculer des paramètres de discrimination forensique spécifiques, également pertinents pour l'analyse de chimérisme, tels que le contenu en information polymorphe (PIC), l'hétérozygotie attendue (HET) et le pouvoir de discrimination (PD), qui démontrent la capacité d'un marqueur génétique ou d'un ensemble de marqueurs à distinguer différents individus au sein d'une population. Les valeurs PIC et HET mettent en évidence le caractère hautement polymorphe des INDELs et un taux élevé d'hétérozygotie pour le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Le PD pour tous les marqueurs DIP varie de 0.5146 à 0.6581, ce qui permet techniquement la discrimination de deux individus sur la base d'au moins un marqueur, mais le PD augmente lorsque davantage de marqueurs sont utilisés en combinaison.

Tableau 18 Probabilité de discrimination de tous les marqueurs inclus dans le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Les valeurs PIC, PD et HET ont été calculées pour chaque marqueur sur la base de l'analyse de 81 individus

Marqueur	PIC	HET	PD
AM	0.3384	0.4341	0.4664
HLD106	0.3066	0.3804	0.5301
HLD70	0.3744	0.5019	0.6572

Marqueur	PIC	HET	PD
HLD84	0.3695	0.4921	0.6328
HLD103	0.3703	0.4938	0.6389
HLD104	0.3651	0.4835	0.6389
HLD116	0.3736	0.5003	0.5322
HLD112	0.3725	0.4982	0.5877
HLD307	0.3736	0.5003	0.6054
HLD310	0.3559	0.4660	0.6152
HLD110	0.3685	0.4901	0.6261
HLD133	0.3703	0.4938	0.6462
HLD79	0.3174	0.3981	0.5603
HLD105	0.3736	0.5003	0.6191
HLD140	0.3623	0.4783	0.5972
HLD163	0.3703	0.4938	0.6060
HLD91	0.3712	0.4954	0.5274
HLD23	0.3559	0.4660	0.5850
HLD88	0.3719	0.4969	0.5597
HLD101	0.3740	0.5012	0.6261
HLD67	0.3384	0.4341	0.5834
HLD301	0.3736	0.5003	0.6054
HLD53	0.3593	0.4724	0.6216
HLD97	0.3736	0.5003	0.6411
HLD152	0.3329	0.4246	0.5146
HLD128	0.3750	0.5030	0.6554
HLD134	0.3384	0.4341	0.5752
HLD305	0.3685	0.4901	0.5530
HLD48	0.3695	0.4921	0.6109
HLD114	0.3593	0.4724	0.6353
HLD304	0.3750	0.5031	0.6520
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

Stabilité en cours d'utilisation

Toutes les études de stabilité ont été planifiées conformément à la norme ISO 23640:2015, ainsi qu'à la directive CLSI EP25 (2^e édition). La procédure suivante a été appliquée pour toutes les études de stabilité : le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a été testé à plusieurs moments dans le temps sur diverses durées. L'analyse des échantillons de chimérisme a été réalisée à l'aide de ChimerisMonitor IVD, l'ADN à génotype unique de XY1726 et XX1180 représentant respectivement le receveur et le donneur.

Nous avons analysé l'ADN à génotype unique XY1726 avec une quantité d'ADN en entrée de 1 ng, ainsi que des échantillons de chimérisme mixte (MC) de XY1726:XX1180 (receveur:donneur) avec une quantité d'ADN en entrée de 1 ng, représentant les différents intervalles de MC de 4 % et 30 % de MC. Pour la stabilité du master-mix, nous avons testé les différents intervalles de MC de 30 %, 5 % et 2 % de MC avec une quantité d'ADN en entrée de 1 ng pour 30 % et 5 % de MC, et de 2 ng pour 2 % de MC.

L'évaluation finale des différentes conditions comprenait la comparaison entre les moyennes du point de départ (t_0) et les différents points temporels (t_n) et a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

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

Pour l'étude de stabilité en cours d'utilisation, trois expériences ont été réalisées : l'une pour tester la stabilité après exposition à des cycles de congélation-décongélation, l'une pour tester la stabilité après une manipulation différente du master-mix, et l'autre pour tester la stabilité des kits lors d'une utilisation simulée après ouverture.

Tous les échantillons testés dans le cadre de l'expérience de stabilité du master-mix ont présenté un profil marqueur complet pour l'ADN à génotype unique DNA XY1726 et se situaient en dessous des limites de précision et d'exactitude basées sur l'erreur totale du test pour les trois échantillons de MC testés : 30 %, 5 % et 2 % MC, avec des limites respectives de 3.31 %, 3.62 % et 1.77 %. Ainsi, le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit reste inchangé quelle que soit la manipulation du master-mix.

Pour la stabilité aux cycles de congélation-décongélation, le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ne présente aucune déviation critique inacceptable par rapport à T_0 et un profil marqueur complet pour l'ADN à génotype unique DNA XY1726 et se situaient en dessous des limites d'exactitude basées sur l'erreur totale du test pour les échantillons de MC testés : 30 % et 4 %, avec des limites de 3.31 % et 2.85 %. Ainsi, le Mentype®

DIPscreen PCR Amplification Kit est stable jusqu'à 20 cycles de congélation-décongélation.

Sur la base des résultats de l'utilisation simulée après ouverture, le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit est stable pendant 12 mois après sa première ouverture, ainsi que pour un maximum de 20 cycles de congélation-décongélation.

Données de performance clinique

Conception de l'étude, aspects éthiques et réglementaires

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit et les méthodes de référence ont été testés sur des échantillons de patients après une allogreffe de CSH. Les 10 patients inclus dans cette étude ont été suivis après l'allo-CSH, et la proportion de donneur dans les échantillons a été analysée 10 fois après l'allogreffe de CSH. L'objectif de cette étude était de fournir des preuves cliniques conformément aux §§ 20 à 24 de la loi sur les dispositifs médicaux 'Medizinproduktegesetz' (MPG, version du 7 août 2002 (BGBl. I S 3146)). En utilisant la méthode de référence cytogénétique FISH, une concordance avec la méthode PCR basée sur les polymorphismes d'insertion-délétion du dispositif devait être démontrée. La confirmation du comité d'éthique compétent a été reçue le 14.03.2012.

Méthodes de référence

Comme méthode de référence, une hybridation fluorescente in situ (FISH) a été réalisée à l'aide du kit CE-IVD spécifique des allosomes CEP® X SpectrumOrange™ / Y SpectrumGreen™ Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden). Pour appliquer la méthode de référence, seules les paires donneur-receveur de sexe différent ont été incluses dans l'étude. Seuls les résultats cytogénétiques avec un nombre de cellules > 200 ont été évalués, conformément aux recommandations des fabricants.

Extraction et purification de l'ADN

L'ADN a été extrait à l'aide du QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE). L'extraction a été réalisée conformément au protocole du fabricant.

Résultats

La forte corrélation entre le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit et la méthode de référence cytogénétique, avec un $R^2 = 0.9889$, confirme son applicabilité pour le suivi du chimérisme après une allogreffe de CSH.

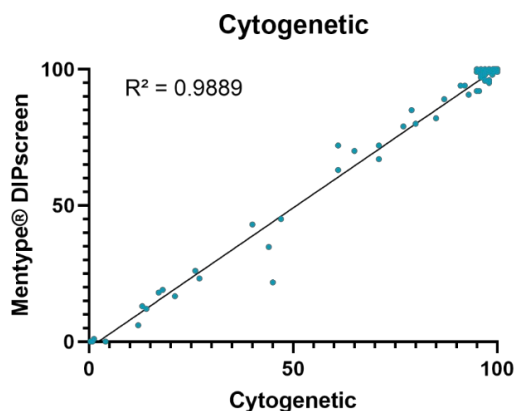


Figure 4 Corrélation entre les résultats cytogénétiques et ceux du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit présentés dans le

graphique. La régression linéaire montre une corrélation acceptable avec un coefficient de détermination de 0.9889 (N = 87)

La concordance obtenue de 94.25 % (Δ MC de 5 % accepté) avec les résultats de la méthode de référence confirme la fiabilité du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit pour l'interprétation des données cliniques.

Évaluation diagnostique

Les caractéristiques de performance clinique ont montré des résultats acceptables. Les résultats ont été évalués par rapport à une LoD de la PCR et de la cytogénétique de 1 % (Bader et al. 2023 [5]). Les paramètres d'évaluation de la performance clinique selon l'Annexe I, section 9.1b du IVDR se sont révélés non entièrement applicables au Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Le dispositif surveille une plage d'analyte plutôt que la présence d'un analyte. Ainsi, une évaluation du statut négatif ou positif de l'analyte n'est pas entièrement applicable.

Tableau 19 Caractéristiques diagnostiques

Caractéristiques diagnostiques	Estimation	Intervalle de confiance inférieur	Intervalle de confiance supérieur
Sensibilité diagnostique	96.0 %	90.6 %	100.0 %
Spécificité diagnostique	76.3 %	62.8 %	89.8 %
Exactitude diagnostique	87.5 %	80.6 %	94.4 %
Valeur prédictive positive	84.2 %	74.7 %	93.7 %
Valeur prédictive négative	93.5 %	84.9 %	100.0 %
Prévalence	56.8 %	46.5 %	67.2 %

Contrôle de qualité

Tous les composants du kit sont soumis à un processus d'assurance qualité rigoureux chez BIOTYPE GmbH. La qualité du kit de test est surveillée en permanence afin de garantir une utilisation sans restriction. N'hésitez pas à nous contacter pour toute question relative à l'assurance qualité.

Assistance technique

Pour toute assistance technique, veuillez contacter notre équipe d'assistance clientèle :

e-mail: support@biotype.de

téléphone: +49 (0)351 8838 400

Références

[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.

Limites d'utilisation

- Les procédures décrites dans cette notice doivent être suivies telles que décrites. Tout écart peut entraîner un échec du test ou des résultats erronés.
- L'utilisation de ce produit est réservée aux professionnels de laboratoire spécialement formés et instruits aux techniques de PCR et d'électrophorèse capillaire sur gel.
- Des procédures appropriées de prélèvement, de transport, de conservation et de traitement des échantillons sont nécessaires pour garantir la performance optimale de ce test.
- Le kit n'a été validé que pour une utilisation avec des échantillons de sang total veineux périphérique humain, traités sur les instruments PCR répertoriés au chapitre Instruments et logiciels.
- Ce test ne doit pas être utilisé directement sur l'échantillon. Des méthodes appropriées d'extraction d'acides nucléiques doivent être réalisées avant l'utilisation de ce test.
- La contamination de l'échantillon d'ADN par du sang altère la performance du produit. Veillez à ce qu'aucune contamination ne se produise pendant L'Extraction d'ADN et répétez l'extraction si nécessaire.
- Le kit n'a été validé qu'avec les kits décrits au chapitre Réactifs, kits et consommables pour l'extraction et la purification de l'ADN.
- Les bonnes pratiques de laboratoire sont requises pour garantir la performance du kit.
- Les résultats doivent être interprétés en concertation avec les cliniciens, qui combinent les résultats des analyses de chimérisme avec ceux d'autres méthodes pertinentes sur le plan thérapeutique ou diagnostique.

- L'interprétation des résultats doit tenir compte de la possibilité de résultats faussement négatifs et faussement positifs.
- Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ne peut pas être utilisé si le donneur et le receveur sont des jumeaux identiques.
- Les doubles transplantations n'ont pas été validées dans le cadre de l'évaluation des performances.
- Un échantillon contenant de l'ADN dégradé peut affecter la capacité à détecter les loci INDEL/DIP et les loci spécifiques du sexe.
- Ne pas utiliser de composants expirés ou mal conservés.
- L'analyse du chimérisme a été validée à l'aide de marqueurs informatifs spécifiques au patient (pour toutes les plages de chimérisme).
- Les échantillons provenant de groupes ethniques différents peuvent présenter des caractéristiques génétiques distinctes, telles que des fréquences alléliques variables, ce qui pourrait limiter le pouvoir de discrimination ou d'amplification. La fréquence allélique de certains marqueurs DIP a été évaluée dans plusieurs populations. Le pouvoir de discrimination combiné est élevé, avec des valeurs supérieures à 0.99. Cela suggère un risque relativement faible que le test d'un patient rencontre des difficultés d'amplification. Toutefois, les données de population actuellement disponibles concernent la population caucasienne. L'impact potentiel pour d'autres groupes ethniques ne peut pas encore être estimé.

Informations de commande

Adressez vos commandes par e-mail à sales@biotype.de.

Produit	Taille de l'emballage	Numéro de commande
Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit	25 réactions	45-12300-0025
	100 réactions	45-12300-0100
Matrix Standard BT5 multi	1 x 25 µL	45-15100-0025
	2 x 25 µL	45-15100-0050
ChimerisMonitor IVD	licence de démonstration licence d'un an licence de 3 ans	46-14800-0000

REMARQUE



Les composants individuels des kits ne peuvent pas être commandés séparément.

Marques et clauses de non-responsabilité

Mentype® et Chimera® sont des marques déposées de BIOTYPE GmbH.

Autres marques: ABI PRISM®, GeneMapper®, GeneAmp® et Applied Biosystems® (groupe Applied Biosystems LLC) ; QIAamp® (Qiagen); POP-4™ (Europe: Applied Biosystems LLC, États-Unis: Life Technologies Corporation).

La PCR est protégée par des brevets. Les titulaires des brevets sont Hoffmann-La Roche Inc. et F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Les noms déposés, marques, etc. utilisés dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

Le Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit est un kit de diagnostic marqué CE conformément au règlement européen relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro (UE) 2017/746.

Le produit n'est pas homologué par Health Canada et n'est ni autorisé ni approuvé par la FDA.

Le dispositif médical n'est pas disponible dans tous les pays.

© 2026 BIOTYPE GmbH ; tous droits réservés.

Explication des symboles



Fabricant



Code de lot



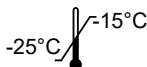
Contient suffisamment de réactifs pour <N> tests



Consulter la notice d'utilisation électronique (eIFU)



Date limite d'utilisation



Limite de température



Numéro de catalogue



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Conserver à l'abri de la lumière du soleil



Conserver au sec



Identifiant unique des dispositifs

Autres marquages utilisés dans cette notice d'utilisation :

i



texte souligné en bleu

texte souligné en noir

texte en retrait, italique et gras

Astuces utiles

Attention, veuillez à respecter cet avis !

Liens menant vers du contenu externe tel que des pages d'accueil, des adresses e-mail

Liens croisés dans le document pour une navigation facile

Champs à cliquer dans un logiciel

Annexe

Électrophérogrammes des échantillons de référence

Vous trouverez sur les pages suivantes des exemples d'électrophérogrammes de l'Mentype® DIPscreen Allelic Ladder ([Figure 5](#)), du Control DNA XY82 (PC, [Figure 6](#)) et d'un témoin sans matrice (NTC, [Figure 7](#)).

Tous les échantillons ont été amplifiés sur un thermocycleur PCR ProFlex et analysés sur un Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer (POP-4™, réseau de 36 cm) selon les paramètres d'exécution validés. L'analyse des données a été réalisée à l'aide de GeneMapper ID-X version 1.6. Les modèles Bins, Panels et l'Analysis Method conformément au [Tableau 12](#) ont été appliqués.

Les électrophérogrammes sont agrandis à une longueur de fragment de 70 – 420 bp (axe x). La plage générale pour l'analyse de la longueur de fragment (axe x) à l'aide du est de 50 bp à 550 bp. La mise à l'échelle de l'axe y a été effectuée individuellement selon la description sous chaque figure ([Figure 5](#), [Figure 6](#), [Figure 7](#)).

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder

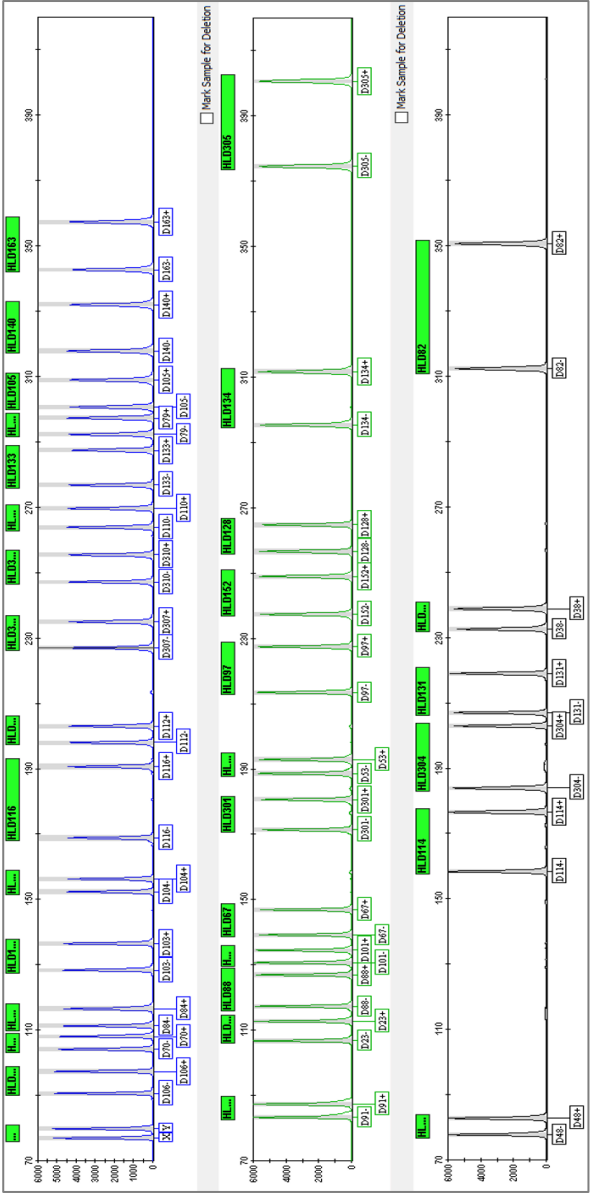


Figure 5 Mentype® DIPscreen Allelic Ladder
Zoom à 6,000 RFU (axe y) et 70 – 420 bp (axe x)

Control DNA XY82 (PC)

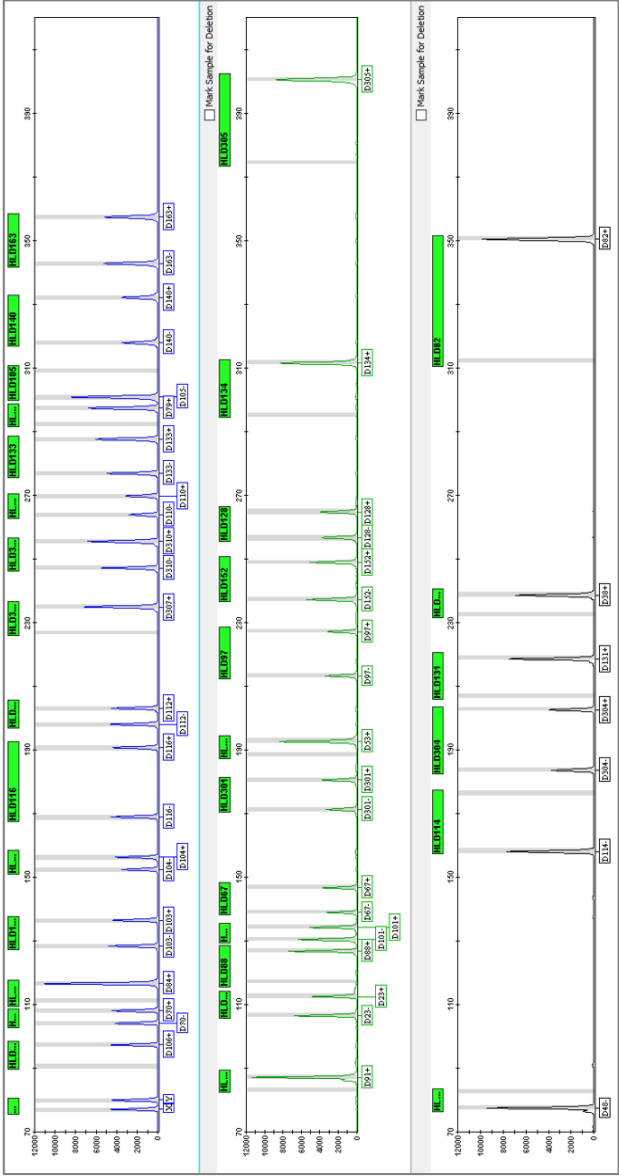


Figure 6 Control DNA XY82 (PC)
Zoom à 12,000 RFU (axe y) et 70 – 420 bp (axe x)

No template control (NTC)



Figure 7 No Template Control (NTC)
Zoom à 1,000 RFU (axe y) et 70 – 420 bp (axe x)

Longueurs des fragments et des allèles

Tableau 20 indique les longueurs de fragment des allèles individuels se référant au DNA Size Standard 550 (BTO). Toutes les analyses ont été réalisées sur un ABI PRISM® 310/3130 Genetic Analyzer avec le polymère POP-4™. Des instruments d'analyse, des étalons de taille d'ADN ou des polymères différents peuvent entraîner des longueurs de fragment différentes. De plus, un alignement visuel avec l'échelle allélique est recommandé.

Tableau 20 Longueurs de fragment de l'Mentype® DIPscreen Allelic Ladder analysée sur un ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer avec le polymère POP-4™, *arrondi à l'entier

Marqueur/ Canal bleu	Taille -DIP [bp]*	Taille +DIP [bp]*	Marqueur/ Canal vert	Taille -DIP [bp]*	Taille +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	Marqueur/ Canal jaune	Taille -DIP [bp]*	Taille +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

Exemples d'évaluation qualitative des loci

Tableau 21 Exemples d'évaluation qualitative des loci informatifs

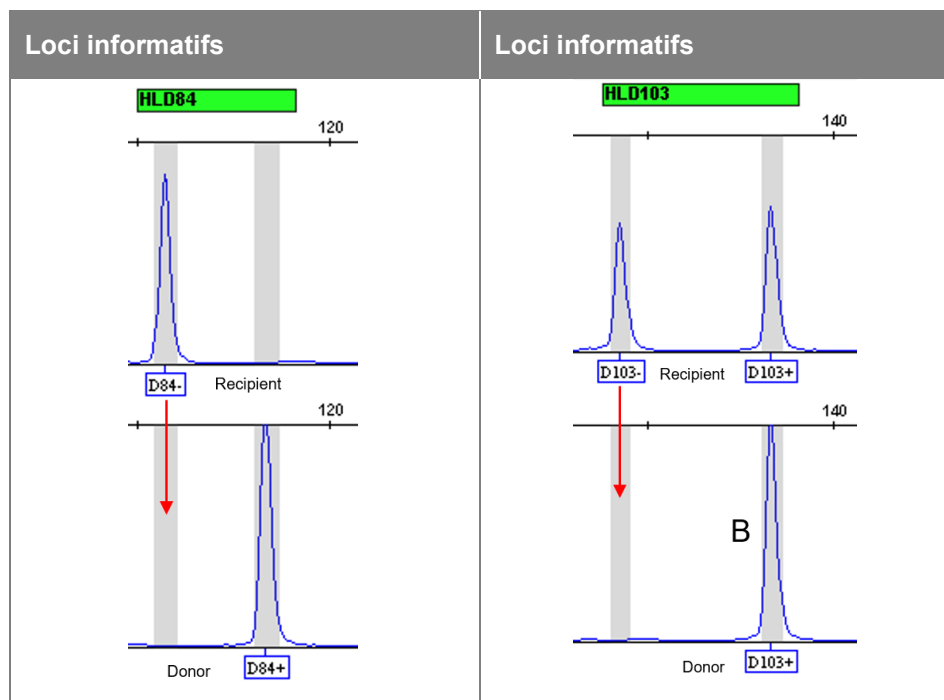
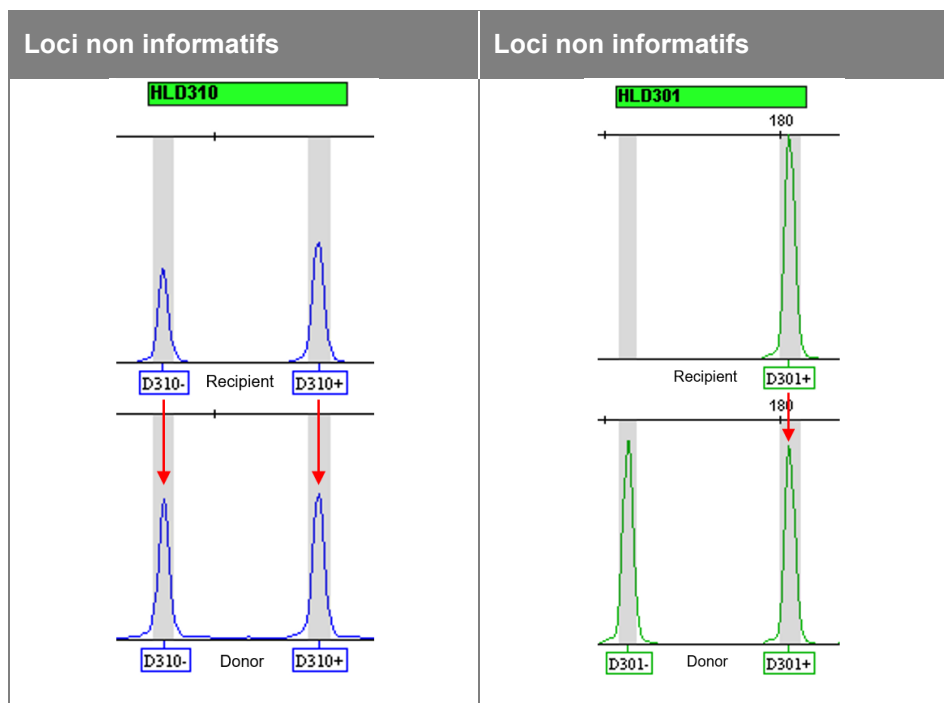


Tableau 22 Exemple d'évaluation qualitative des loci non informatifs

BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Tel.: +49 351 8838 400

Fax: +49 351 8838 403

www.biotype.de

Commande

sales@biotype.de

Service client et assistance

support@biotype.de

