# Mentype® Chimera®

PCR Amplification Kit

## Instructions d'utilisation (IFU)

IVD CE 0483 Pour le diagnostic in vitro

CHNIFU02v1fr
13.10.2026

REF
45-12200-0025
45-12200-0100
45-12200-0400

LOT Code de lot

BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY
Site Web: www.biotype.de
E-mail: support@biotype.de
Commande: sales@biotype.de

BIOTYPE

# Avis de modification

Veuillez noter les adaptations suivantes par rapport à la version précédente de la notice d'utilisation:

| Code du document | Modifications | Date |
|---|---|---|
| **CHNIFU02v1fr** | Version initiale | 13.10.2026 |

**Une version imprimée de cette notice d'utilisation peut être fournie gratuitement sous 7 jours.**

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

**au +49 351 8838 400 ou**

**support@biotype.de**

# Sommaire

**Usage prévu** ..... **4**
**Contexte scientifique** ..... **4**
**Description du produit** ..... **5**
**Matériel fourni** ..... **7**
Contenu du kit ..... 7
Description des composants ..... 8
**Conservation et manipulation des réactifs** ..... **10**
**Matériel et dispositifs nécessaires mais non fournis** ..... **10**
Équipement général de laboratoire ..... 10
Réactifs, kits et consommables ..... 11
Instruments et logiciels ..... 12
Échantillons et prélèvements à tester ..... 13
**Avertissements et précautions** ..... **14**
**Avis à l'utilisateur** ..... **15**
**Procédure** ..... **16**
Aperçu du flux de travail expérimental ..... 16
Préparation des échantillons ..... 17
Exigences relatives à l'échantillon brut ..... 17
Extraction de l'ADN ..... 17
Quantification et dilution de l'ADN ..... 18
Conservation de l'ADN ..... 19
Préparation des contrôles ..... 19
Contrôle positif PC ..... 19
Contrôle sans matrice NTC ..... 19
Préparation du mélange réactionnel ..... 20
Amplification PCR ..... 22
**Électrophorèse capillaire sur gel** ..... **23**
Préparation des produits PCR ..... 23

Analyse de longueur de fragments ..... 25
**Analyse des données ..... 27**
Procédure générale pour l'analyse des données ..... 27
Validation du workflow de run ..... 28
DNA Size Standard 550 (BTO) ..... 28
Mentype® Chimera® Allelic Ladder ..... 29
Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 (PC) ..... 29
Contrôle sans matrice NTC ..... 30
Analyse des échantillons ..... 31
Workflow d'analyse des données ..... 31
Analyse qualitative – identification des loci informatifs ..... 32
Analyse semi-quantitative – analyse du chimérisme ..... 32
Analyse des données avec ChimerisMonitor IVD ..... 36
Analyse des données avec GeneMapper™ ID-X ..... 38
Préparation du GeneMapper™ ID-X logiciel ..... 38
**Dépannage ..... 42**
**Évaluation des performances ..... 44**
Stabilité en cours d'utilisation ..... 54
Données de performance clinique ..... 55
**Contrôle qualité ..... 57**
**Assistance technique ..... 57**
**Références ..... 58**
**Limites d'utilisation ..... 60**
**Informations de commande ..... 62**
**Marques et avis de non-responsabilité ..... 62**
**Explication des symboles ..... 64**
**Annexe ..... 66**

# Usage prévu

Le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit est un test manuel destiné à la surveillance du chimérisme chez les patients adultes atteints de leucémie ayant subi une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (allo-HSCT), à partir d'ADN génomique extrait d'échantillons de sang veineux périphérique total. Le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit détecte 12 polymorphismes de répétitions courtes en tandem (STR) ainsi que le polymorphisme d'insertion-délétion (DIP) de l'amélogénine, en une seule réaction de PCR multiplex. Ces polymorphismes sont utilisés pour la détection qualitative des génotypes du patient et du donneur, afin d'identifier les allèles STR spécifiques au patient avant l'évaluation du chimérisme. Après l'allo-HSCT, les allèles informatifs spécifiques au patient sont analysés afin de réaliser une surveillance semi-quantitative du chimérisme.

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

# Contexte scientifique

La transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) est une option thérapeutique permettant de traiter 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 receveurs d'une allo-HSCT, afin de détecter les signes précoces de rejet du greffon. Le sang veineux périphérique humain est utilisé pour le génotypage et la surveillance. Selon les recommandations du CLSI (MM05-A2, 2$^{e}$ édition), des anticoagulants tels que l'EDTA et le citrate sont recommandés pour le prélèvement sanguin. Selon la réussite 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), la numération sanguine et les méthodes basées sur la PCR. Actuellement,

l'amplification par PCR de polymorphismes de répétitions courtes en tandem (STR) constitue la méthode de référence pour l'analyse du chimérisme. Pour détecter les signes précoces de rejet du greffon, l'analyse du chimérisme doit être réalisée à intervalles réguliers et peu après la transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques (HSCT).

# Description du produit

Le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit est un kit d'amplification par réaction en chaîne par polymérase (PCR) multiplex, développé pour la surveillance du chimérisme. Pour la différenciation donneur-receveur, des répétitions courtes en tandem (STR) hautement polymorphes, présentant un taux d'hétérozygotie très élevé et une distribution allélique équilibrée sur 12 chromosomes (voir Tableau 1) sont amplifiées simultanément en une seule réaction de PCR. Une amorce pour chaque locus est marquée avec le fluorophore 6-FAM™, BTG, ou BTY. Les produits PCR sont ensuite analysés par électrophorèse capillaire sur gel.

**Tableau 1 Informations spécifiques à chaque locus du Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit,** * allèles conformes aux recommandations relatives à l'utilisation des marqueurs microsatellites de l'International Society for Forensic Genetics (ISFG)

| Locus* | GenBank Numéro d'accession | Localisation chromosomique | Réf. |
|---|---|---|---|
| Amelogenin X Amelogenin Y | M55418; M55419 | Xp22.1-22.3; Yp11.2 | Thiede et al. 1999 [1] |
| D2S1360 | G08130 | 2p24-p22 | Lion et al. 2012, Thiede et al. 2004, Becker et al. 2007 [2, 3, 4] |
| D3S1744 | G08246 | 3p24 | Thiede et al. 2004, Becker et al. 2007 [4, 5] |
| D4S2366 | G08339 | 4p16-15.2 | Thiede et al. 2004, Becker et al. 2007 [4, 5] |
| D5S2500 | G08468 | 5q11.2 | Thiede et al. 2004, Becker et al. 2007 [4, 5] |
| D6S474 | G08540 | 6q21-22 | Becker et al. 2007 [4] |
| D7S1517 | G18365 | 7q31.33 | Lion et al. 2012, Thiede et al. 2004, Becker et al. |

| Locus* | GenBank Numéro d'accession | Localisation chromosomique | Réf. |
|---|---|---|---|
| | | | 2007, Wiegand et al. 2002 [2, 4, 5, 6] |
| D8S1132 | G08685 | 8q23.1 | Lion et al. 2012, Thiede et al. 2004, Becker et al. 2007, Wiegand et al. 1998, Hering et al 2001 [2, 4, 5, 7, 8] |
| D10S2325 | G08790 | 10p12 | Lion et al. 2012, Thiede et al. 2004, Becker et al. 2007, Wiegand et al. 1999 [2, 5, 4, 9] |
| D12S391 | G08921 | 12p13.2 | Lion et al. 2012, Becker et al. 2007, Wiegand et al. 1999, Lareau et al. 1996 [2, 4, 9, 10] |
| D18S51 | L18333 | 18q21.3 | Lion et al. 2012, Thiede et al. 2004, Barber et al. 1996 [2, 5, 11] |
| D21S2055 | G27274 | 21q22 | Henke et al. 2007, Schmid et al. 2005 [12, 13] |
| SE33 (ACTBP2) | NG000840 | 6q14.2 | Lion et al. 2012, Thiede et al. 2004, Urquhart 1993 [2, 5, 14] |

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

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

La plage de quantité d'ADNg apporté dans des conditions standard est de 0.125 - 2.0 ng d'ADNg. L'apport optimal en ADNg est de 1 ng dans des conditions standard.

Une sensibilité de 1.4 % $LoD_{95}$ (limite de détection) peut être atteinte en utilisant 1 ng d'ADNg en entrée, pour l'analyse des marqueurs informatifs. Pour atteindre la sensibilité susmentionnée, il est recommandé d'utiliser autant de marqueurs informatifs que possible, avec un minimum de trois. De plus, les régions de stutter n+1 ont été testées, ce qui a entraîné des limitations supplémentaires de sensibilité, augmentant la LoD à 4.3 %.

# Matériel fourni

## Contenu du kit

### Tableau 2 Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit – contenu

| Réactif | Couleur du bouchon | | Volume par taille de conditionnement | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 25 réactions | 100 réactions | 400 réactions |
| Nuclease-Free Water | Bleu clair | | 1.5 mL | 2 x 1.5 mL | 6 x 1.5 mL |
| Reaction Mix A | Violet | | 125 µL | 500 µL | 2 x 1.0 mL |
| Mentype® Chimera® Primer Mix | Rouge | | 63 µL | 250 µL | 4 x 250 µL |
| Multi Taq 2 DNA Polymerase | Blanc | | 10 µL | 40 µL | 160 µL |
| Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 (2 ng/µL) | Blanc | | 10 µL | 10 µL | 10 µL |
| DNA Size Standard 550 (BTO) | Orange | | 13 µL | 50 µL | 200 µL |
| Mentype® Chimera® Allelic Ladder | Vert | | 25 µL | 25 µL | 4 x 25 µL |

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

**REMARQUE**

Veuillez noter que la taille de conditionnement indique le nombre de tests **sans** tenir compte du nombre de contrôles requis ou de l'excès 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 - 45 échantillons par run PCR: conditionnement de 100 réactions
- > 45 échantillons par run PCR : conditionnement de 400 réactions

## Description des composants

**Nuclease-Free Water:** eau de qualité PCR, utilisée lors de la préparation de la PCR et comme contrôle 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® Chimera® Primer Mix:** mélange d'amorces oligonucléotidiques multiplex contenant une amorce marquée (marquage: 6-FAM™, BTG, BTY) et des amorces non marquées.

**Multi Taq 2 DNA Polymerase:** ADN polymérase Taq hot start, 2.5 U/µL.

**Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 (2 ng/µL):** ADN génomique isolé à partir de sang EDTA provenant d'un seul donneur humain de sexe masculin. L'ADN est hétérozygote pour chaque marqueur du Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit, utilisé comme contrôle positif externe qualitatif.

**REMARQUE**

Le Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 ne présente pas de risque significatif pour le professionnel de laboratoire, car il est constitué de molécules d'ADN individuelles purifiées, non dangereuses et dépourvues de toute fonction biologique active. Il ne contient ni cellules vivantes ni organismes pathogènes susceptibles de constituer une menace directe.

**DNA Size Standard 550 (BTO):** mélange de fragments PCR marqués par fluorescence, de longueurs définies comprises entre 60 et 550 pb; ce composant est ajouté à chaque produit PCR avant l'analyse de la longueur des fragments et sert à établir une courbe d'étalonnage de taille permettant de déterminer précisément la longueur des fragments PCR.

**Mentype® Chimera® Allelic Ladder:** mélange de produits PCR artificiels représentant la plupart des 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 de la Multi Taq 2 DNA Polymerase, qui est conservée dans un tampon empêchant la congélation du réactif.

Veuillez vérifier l'intégralité du kit dès sa réception. N'utilisez pas de kits ayant 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® Chimera® Primer Mix, DNA Size Standard 550 (BTO) et Mentype® Chimera® 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, la Mentype® Chimera® Control DNA XY1726) et les composants de post-amplification (DNA Size Standard 550 (BTO) et Mentype® Chimera® Allelic Ladder) soient conservés et utilisés séparément des réactifs de PCR (NucleaseFree Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A et Mentype® Chimera® Primer Mix).

La date de péremption est indiquée sur l'étiquette de la boîte du kit. Ne pas dépasser un maximum de 20 cycles de congélation-décongélation.

# Matériel et dispositifs nécessaires mais non fournis

## Équipement général de laboratoire

- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour tubes de réaction de 2 mL et 200 µL
- Centrifugeuse avec rotor pour plaques de microtitration à 96 puits
- Agitateur vortex
- Pipettes réglables 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 dispositif de fermeture correspondant, qualité PCR
- Portoirs adaptés aux tubes de réaction de 2 mL et 200 µL
- Portoir réfrigérant adapté aux tubes de 2 mL
- Gants à usage unique non poudrés
- Spectrophotomètre NanoDrop™ One ou Fluoromètre Qubit™

**REMARQUE**

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

## Réactifs, kits et consommables

**Tableau 3 Réactifs nécessaires 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® DNA Blood Mini Kit, 50 preps | Qiagen | 51304 |
| QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (IVD) | Qiagen | 61104 |
| NucleoSpin® DX Blood (IVD) | Machery-Nagel | 740899.50 |
| Hi-Di™ Formamide, 25 mL | Thermo Fisher Scientific | 4311320 |
| POP-4™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 échantillons) | Thermo Fisher Scientific | 4393715 |
| POP-7™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 échantillons) | Thermo Fisher Scientific | 4393708 |
| Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series | Thermo Fisher Scientific | 4393927 |
| Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series | Thermo Fisher Scientific | 4408256 |

| Réactif | Fournisseur | Numéro de commande |
|---|---|---|
| 3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 36 cm | Thermo Fisher Scientific | 4404683 |
| 3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 50 cm | Thermo Fisher Scientific | 4404685 |
| SeqStudio™ Cartridge | Thermo Fisher Scientific | A33671A41331 |
| SeqStudio™ Cathode Buffer | Thermo Fisher Scientific | A33401 |

## Instruments et logiciels

Le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit a été validé pour une utilisation avec les cycleurs PCR suivants:

- ProFlex PCR System (n° cat.: 4484073 (bloc échantillon 3 x 32 puits), 4484075 (bloc échantillon 96 puits); Thermo Fisher Scientific)
- GeneAmp PCR System 9700 Aluminium (discontinué, n° cat. N805-0200; Thermo Fisher Scientific)
- Mastercycler nexus gradient (n° cat.: 6331000017, Eppendorf AG)
- Biometra TOne (discontinué, n° cat.: 050-0901; Analytik Jena)
- Biometra Tadvanced (n° cat.: 846-2-070-211; 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
- Rampe de température réglable jusqu'à 2 °C/s

Le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit a été validé pour une utilisation avec les instruments et paramètres suivants. Un seul des dispositifs analytiques listés ci-dessous est nécessaire pour réaliser le test:

- Analyseur génétique 3500 (n° cat.: 4405673; Thermo Fisher Scientific), version logicielle 4.0.1
    - Polymère POP-4™ pour Analyseur génétique 3500/3500xL

  - Polymère POP-7™ pour Analyseur génétique 3500/3500xL
  - Analyseur génétique 3500 avec matrice 8 capillaires de 36cm
  - Analyseur génétique 3500 avec matrice 8 capillaires de 50cm

- Analyseur génétique SeqStudio™ (n° cat.: A35644; Thermo Fisher Scientific), version logicielle 1.1.4

Le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit a été validé pour une utilisation 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 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.

- ChimerisMonitor IVD (BIOTYPE GmbH)
- Logiciel GeneMapper™ ID-X, version 1.6 (Thermo Fisher Scientific), avec les éléments spécifiques au produit suivants:
  - AnalysisMethod: ChimeraIVD_Analysis_v1x
  - Bin: ChimeraIVD_Bins_v1x
  - Panel: ChimeraIVD_Panel_v1x
  - Stutter: ChimeraIVD_Stutter_v1x
  - Size Standard: BTO_60-550_v1x

**REMARQUE**

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

## Échantillons et prélèvements à tester

Les échantillons suivants ont été validés avec le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit:

- ADN génomique isolé à partir de sang veineux périphérique total 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'isolement de l'ADN.

## Avertissements et précautions

- Lire attentivement la notice d'utilisation avant d'utiliser le produit.
- Lire les fiches de données de sécurité (SDS) et les déclarations de non-dangerosité (DND) pour tous les produits BIOTYPE, disponibles sur demande ou via notre page d'accueil (www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter). Pour les produits ne nécessitant pas de SDS car ils ne contiennent pas de SVHC ou sont soumis à d'autres restrictions du règlement 1272/2008 (CLP), BIOTYPE fournit la SDS sur demande.
- Veuillez contacter les fabricants du matériel et des réactifs nécessaires mais non fournis pour obtenir des copies des SDS pour tout réactif supplémentaire nécessaire.
- Les composants de kits provenant de lots différents ne doivent pas être mélangés.
- L'aliquotage des composants du kit dans d'autres récipients de réaction n'est pas autorisé.
- L'utilisation de ce produit est réservée aux utilisateurs professionnels de laboratoire, formés aux techniques de génétique moléculaire, à la PCR multiplex et à la manipulation des Genetic Analyzers de Thermo Fisher Scientific.
- Avant la première utilisation, vérifier le produit et ses composants quant à :
    - Intégrité
    - Exhaustivité en ce qui concerne le nombre, le type et le remplissage (voir le chapitre Matériel fourni)
    - Étiquetage correct
    - État congelé à l'arrivée (à l'exception de la Multi Taq 2 DNA Polymerase)
- Les échantillons doivent toujours être traités comme potentiellement infectieux et/ou biodangereux, conformément aux procédures de laboratoire sûres et aux bonnes pratiques de laboratoire.

- Ne pas utiliser un kit dont la date de péremption est dépassée.
- Éliminer les échantillons et les déchets du test conformément à la réglementation locale en matière de sécurité.
- Tous les instruments utilisés doivent avoir été installés, calibrés, contrôlés et entretenus conformément aux instructions et recommandations du fabricant.

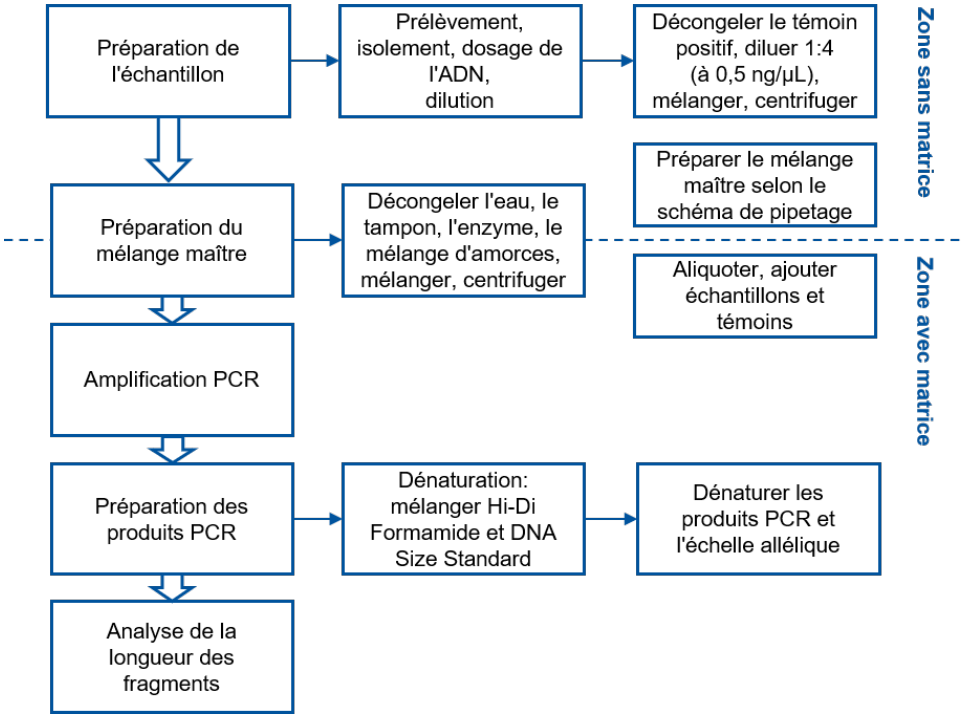
## Avis à l'utilisateur

Tout problème survenant en lien 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 (UE) 2017/746 et vise à donner un accès public, via la base de données EUDAMED, à un résumé actualisé des données de sécurité et de performance du dispositif à l'attention des utilisateurs prévus, en l'occurrence, pour ce produit, exclusivement les professionnels de laboratoire.

# Procédure

## Aperçu du flux de travail expérimental



## Préparation des échantillons

### Exigences relatives à l'échantillon brut

Prélever au moins 200 µL de sang veineux périphérique total pour la procédure suivante.

La manipulation du matériel d'échantillon brut (sang veineux périphérique total) doit suivre les recommandations des lignes directrices du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) MM05–A2 (2nd edition), qui indiquent 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**

Une conservation prolongée du matériel d'échantillon brut peut entraîner une fragmentation du matériel génétique et, par conséquent, une qualité insuffisante du matériel. Cela peut nuire au résultat de l'analyse, par exemple par l'obtention de profils incomplets.

### Extraction de l'ADN

Effectuer l'extraction et la purification de l'ADN à partir d'échantillons de sang veineux périphérique total 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
- QIAamp® DNA Blood Mini Kit
- Macherey-Nagel NucleoSpin® Dx Blood, kit Mini certifié CE pour l'extraction d'ADN à partir de sang

**REMARQUE**



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

**REMARQUE**



Veiller 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**

Quantifier 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™.

En cas d'utilisation de la spectrophotométrie, utiliser 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, ou conformément aux recommandations du fabricant du kit d'extraction d'ADN.

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

Pour une utilisation avec le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit, diluer les échantillons d'ADN à une concentration optimale de 1.0 ng/µL. Préparer la dilution extemporanément avant utilisation. Utiliser de l'eau exempte de nucléases comme diluant.

**REMARQUE**

La plage totale d'apport pour le kit est de 0.125 – 2.0 ng d'ADN par réaction, **l'apport optimal est de 1 ng d'ADN** par réaction dans des conditions standard, pour une sensibilité maximale. Un apport inférieur à 0.125 ng peut entraîner des profils incomplets, tandis qu'un apport plus élevé peut entraîner des pics de fuite.

### Conservation de l'ADN

L'ADN doit être conservé non dilué entre -25 °C et -15 °C pour une conservation à long terme, ou conformément aux informations du fabricant du kit d'isolement de l'ADN.

## Préparation des contrôles

### Contrôle positif PC

Décongeler le Mentype® Chimera® Control DNA XY1726, l'homogénéiser par vortex puis effectuer une brève centrifugation.

Diluer le Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 au 1:4, de 2.0 ng/µL à 0.5 ng/µL, à l'aide de l'eau exempte de nucléases.

Homogénéiser le PC dilué par une brève agitation au vortex. Centrifuger ensuite brièvement le PC dilué (environ 10 s). Ne pas conserver le contrôle positif dilué.

**REMARQUE**

Toujours utiliser une dilution fraîchement préparée du Mentype® Chimera® Control DNA XY1726.

### Contrôle sans matrice NTC

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

## Préparation du mélange réactionnel

Sortir les composants suivants du Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit pour la préparation du mélange réactionnel:

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

Tous les composants congelés doivent être décongelés à température ambiante (22 °C à 25 °C, environ 30 min, à l'abri de la lumière) et homogénéisés par retournement des tubes ou par agitation douce au vortex. Centrifuger ensuite brièvement les réactifs (environ 10 s). Afin de respecter les principes des bonnes pratiques de laboratoire, il est conseillé de conserver la Multi Taq 2 DNA Polymerase dans un environnement réfrigéré aussi longtemps que possible (par exemple, sur portoir réfrigérant) avant la préparation du mélange réactionnel.

**REMARQUE**



Mélanger la Multi Taq 2 DNA Polymerase par tapotement pour une meilleure stabilité. **Ne pas vortexer l'enzyme.**

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

**REMARQUE**



En règle générale, si vous testez moins de 10 échantillons, prévoir suffisamment de mélange réactionnel pour un échantillon supplémentaire. Si vous testez 10 échantillons ou plus, prévoir un excédent de 10 % de mélange réactionnel.

**Tableau 4 Préparation du mélange réactionnel PCR,** * Le volume dépend de la concentration d'ADN. Si un volume plus important d'ADN matrice est utilisé, veiller à ajuster le volume d' eau sans nucléase. Le volume total de réaction (rxn.) par réaction doit toujours être de 25.0 µL.

| | Volume | | |
|---|---|---|---|
| **Composant** | **1 rxn.** | **5 rxn.** | **10 rxn.** |
| Nuclease-Free Water* | 16.1 µL | 80.5 µL | 161.0 µL |
| Reaction Mix A | 5.0 µL | 25.0 µL | 50.0 µL |
| Mentype® Chimera® Primer Mix | 2.5 µL | 12.5 µL | 25.0 µL |
| Multi Taq 2 DNA Polymerase | 0.4 µL | 2.0 µL | 4.0 µL |
| Matrice d'ADN ou échantillon de contrôle | 1.0 µL* | 5 x 1.0 µL* | 10 x 1.0 µL* |
| **Volume total** | **25.0 µL** | **125.0 µL** | **250.0 µL** |

Mélanger le mix réactionnel par vortex doux, puis centrifuger brièvement le mélange.
Répartir 24.0 µL du mix réactionnel PCR dans les tubes PCR de 200 µL préparés et centrifuger brièvement les tubes fermés.

**Application des matrices d'ADN et des contrôles**

Ajouter 1.0 µL des types d'échantillons suivants dans les tubes PCR préparés contenant le mix réactionnel PCR.

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

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

**PC**: ajouter 1.0 µL de la solution de Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 préalablement diluée au 1/4 (0.5 ng/µL) à la place d'un échantillon.

**REMARQUE**

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

**REMARQUE**



Utiliser au moins un contrôle positif (PC) et un contrôle sans matrice (NTC) par run. Dans le cas contraire, le run ne peut pas être validé.

Fermer tous les tubes PCR, vortexer doucement et centrifuger brièvement.

## Amplification PCR

Programmer le thermocycleur PCR selon le profil d'amplification suivant; Régler la rampe à 2 °C/s. Effectuer une PCR « hot start » afin d'activer la polymérase et d'empêcher 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 | 30 cycles |
| 72 °C | 75 s | |
| 68 °C | 60 min | |
| 10 °C | ∞ | maintien |

**REMARQUE**



Si des thermocycleurs avec des étapes de chauffage et de refroidissement rapides (> 2 °C/s) sont utilisés, **la rampe doit être ajustée à 2 °C/s** afin d'assurer un équilibre optimal des signaux.

**REMARQUE**

Pour des informations de base concernant l'installation, la programmation et la maintenance des différents thermocycleurs PCR, veuillez consulter le manuel d'utilisation de l'appareil concerné.

**REMARQUE**

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

# Électrophorèse capillaire sur gel

## Préparation des produits PCR

Une fois la PCR terminée, retirer les échantillons du thermocycleur et centrifuger brièvement.

**REMARQUE**

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

Décongeler, mélanger et centrifuger les réactifs:

- Hi-Di™ Formamide (non fourni avec le kit)
- Mentype® Chimera® Allelic Ladder (bouchon vert)
- DNA Size Standard 550 (BTO) (bouchon orange)

Préparer le mix de dénaturation décrit dans le Tableau 6 et prévoir une ou deux réactions supplémentaires pour compenser les variations de pipetage. Inclure une réaction supplémentaire pour l'échelle allélique.

**Tableau 6 Mix de dénaturation**

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

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

Ajouter soit 1.0 µL de produit PCR, soit 1.0 µL de Mentype® Chimera® Allelic Ladder dans les puits. Sceller la plaque PCR avec un film adapté, vortexer et centrifuger brièvement la plaque.

**REMARQUE**

L'échelle allélique est utilisée pour déterminer correctement les fragments analysés lors de l'analyse des données. Dans chaque run d'analyse de la longueur de fragments, 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, remplir les puits supplémentaires de la plaque avec 12.0 µL de Hi-Di™ Formamide selon le nombre de capillaires.

Dénaturer les produits PCR préparés sur un thermocycleur pendant 3 minutes à 95 °C, puis refroidir les échantillons à +4 °C dans le thermocycleur. Centrifuger brièvement les échantillons avant l'analyse de longueur de fragments.

## Analyse de longueur de fragments

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

**REMARQUE**

Se référer 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.

Une fois que le Matrix Standard BT5 multi a été exécuté avec succès, importer les paramètres d'appareil fournis pour le 3500 Series Genetic Analyzer comme décrit dans le Tableau 7 (www.biotype.de/en/template-files).

Pour la configuration des modules de run du SeqStudio™ Genetic Analyzer veuillez consulter le Tableau 8.

**Tableau 7 fichiers fournis pour le 3500 Series Genetic Analyzer (www.biotype.de/en/template-files)**

| 3500 Series Genetic Analyzer | |
|---|---|
| Instrument Protocol | POP-4™, réseau de capillaires 36 cm :<br>ChimeraIVD_Instrument436.xml<br>POP-7™, réseau de capillaires 50 cm :<br>ChimeraIVD_Instrument750.xml |
| Size Standard Protocol | BTO_60-550_SizeStandard.xml |
| Sizecalling Protocol | BTO_60-550_Sizecalling.xml |
| Assay | POP-4™, réseau de capillaires 36 cm :<br>ChimeraIVD_Assay436.xml<br>POP-7™, réseau de capillaires 50 cm :<br>ChimeraIVD_Assay750.xml |

Les spécifications du protocole d'appareil requis sont décrites dans le Tableau 8. Seuls les paramètres décrits doivent être ajustés ; les autres paramètres doivent rester aux réglages par défaut. Suivre les instructions d'utilisation du fabricant pour définir les paramètres de fonctionnement spécifiques.

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

| | Injection Voltage [kV] | Injection Time [s] | Run Voltage [kV] | Run Time [s] |
|---|---|---|---|---|
| 3500 Series Genetic Analyzers | 3.0 | 8 | Réseau de capillaires 36 cm: **15** Réseau de capillaires 50 cm: **19.5** | 1560 |
| SeqStudio™ Genetic Analyzer | 1.2 | 10 | 9 | 1560 |

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 (Size Standard), les tailles suivantes du DNA Size Standard 550 (BTO) doivent être attribuées au panel orange:

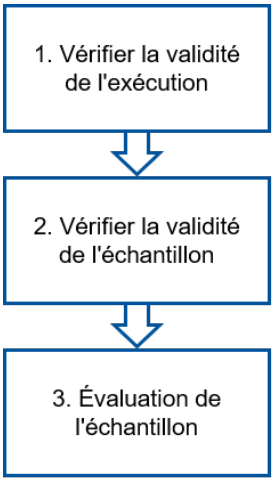
**60**, **80**, **90**, **100**, **120**, **140**, **160**, **180**, **200**, **220**, **240**, **250**, **260**, **280**, **300**, **320**, **340**, **360**, **380**, **400**, **425**, **450**, **475**, **500**, **525**, et **550** bp.

**REMARQUE**

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

# Analyse des données

## Procédure générale pour l'analyse des données

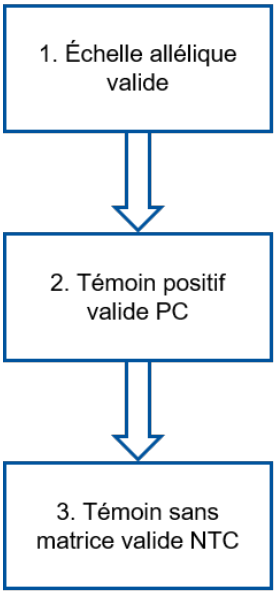



- Voir le chapitre **Validation du déroulement de l'exécution**
- Voir le chapitre **Analyse des échantillons**
- Voir le chapitre **Analyse qualitative – identification des loci informatifs**
- Voir le chapitre **Analyse semi-quantitative – analyse du chimérisme**

**REMARQUE**

L'analyse des données doit être 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 des données, sans recourir à l'une des deux options logicielles décrites pour l'analyse et l'évaluation des données, n'est pas validée.

**Validation du workflow de run**




- Valide DNA Size Standard 550 (BTO) seuil : ≥ 50 RFU
- Hauteur de pic valide seuil : ≥ 200 RFU
- Tous les pics attendus sont présents (voir Figure 6 en annexe)

- Valide DNA Size Standard 550 (BTO) seuil : ≥ 50 RFU
- Hauteur de pic valide seuil : ≥ 200 RFU
- Tous les pics attendus sont présents (voir Figure 7 en annexe)

- Valide DNA Size Standard 550 (BTO) seuil : ≥ 50 RFU
- Aucun pic détecté au-dessus du seuil ≥ 200 RFU (voir Figure 8 en annexe)

**REMARQUE**

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

**DNA Size Standard 550 (BTO)**

La détermination précise des longueurs 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 STR, la détermination de la taille doit reposer sur des références régulièrement réparties.

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

- Présence de tous les fragments à : **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 continuellement en hauteur de pic à mesure que la longueur des fragments augmente.

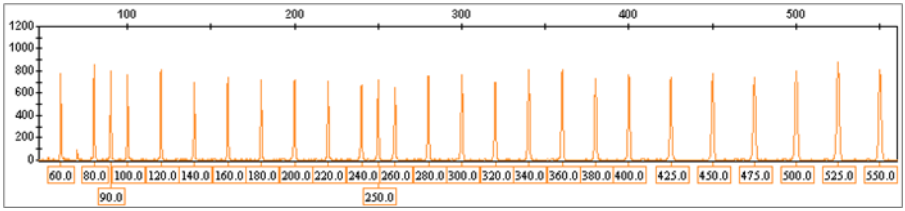



**Figure 1 Électrophérogramme du DNA Size Standard 550 (BTO), fragments avec longueurs en bp**

### Mentype® Chimera® Allelic Ladder

Après avoir vérifié la validité de l'étalon de taille, s'assurer que tous les pics disponibles dans l'échelle allélique sont présents avec des hauteurs de pic supérieures ou égales à **200 RFU**.

**REMARQUE**

L'Mentype® Chimera® Allelic Ladder comprend des fragments pour la plupart, mais pas pour la totalité des allèles. Veuillez comparer les allèles avec l'annexe Tableau 22 - Tableau 24 et Figure 5.

### Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 (PC)

Après avoir vérifié la validité de l'étalon de taille, s'assurer 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 Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 est un contrôle PCR qualitatif permettant de vérifier de manière générale la performance du mix réactionnel.

Le Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 (voir annexe Figure 6), qui fait partie du kit de test, représente les allèles suivants:

**Tableau 9 Génotype du Mentype® Chimera® Control DNA XY1726**

| Locus | Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 | Locus | Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 |
|---|---|---|---|
| **Panel bleu** | | **Panel vert** | |
| Amélogénine | X / Y | D8S1132 | 18 / 22 |
| D7S1517 | 19 / 25 | D5S2500 | 10 / 17 |
| D3S1744 | 14 / 18 | D18S51 | 12 / 13 |
| D12S391 | 21 / 25 | D21S2055 | 19.1 / 21.1 |
| D2S1360 | 25 / 29 | **Panel jaune** | |
| D6S474 | 14 / 15 | D10S2325 | 9 / 11 |
| D4S2366 | 9 / 11 | SE33 | 26.2 / 28.2 |

**Contrôle sans matrice NTC**

Après avoir vérifié la validité de l'étalon de taille, vérifier qu'aucun pic supérieur **ou égal à 200 RFU** n'est détecté dans la plage de bins du NTC (voir annexe Figure 7).

**REMARQUE**

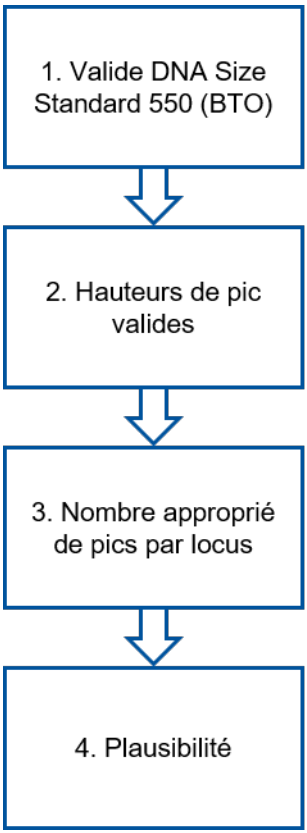
En utilisant ChimerisMonitor IVD ou GeneMapper™ ID-X avec les fichiers modèles fournis pour la méthode d'analyse, les pics < 200 RFU ne se voient pas automatiquement attribuer de nom d'allèle, ce qui facilite l'évaluation des résultats.

**REMARQUE**

Des artefacts tels que de petites taches de colorant (dye blobs) peuvent apparaître de manière 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'amplicon est possible.

## Analyse des échantillons

### Workflow d'analyse des données




- Voir le chapitre précédent
- Échantillons de génotypage : seuil pour tous les pics: ≥ 200 RFU
- Échantillons de surveillance : seuil pour tous les pics: ≥ 200 RFU
- Aucun pic de pull-up
- Échantillons de génotypage: min. 1, max. 2 pics par locus
- Échantillons de surveillance: min. 1, max. 4 pics par locus
- Échantillons de surveillance: seuls les pics d'allèles également présents chez le receveur et le donneur (aucun pic supplémentaire)

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 décrit l'identification et la différenciation des loci spécifiques au receveur. Ainsi, les loci spécifiques au donneur sont définis comme non informatifs. L'identification des loci informatifs est réalisée à partir des données du receveur et du donneur avant la transplantation. Pour des exemples, voir Tableau 25 en annexe.

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

**Loci informatifs**: au moins un allèle de l'échantillon du receveur ne peut pas être détecté dans l'échantillon du donneur. Cet allèle ne doit pas se situer dans la zone de stutter de l'échantillon du donneur.

**Loci stutter (n+1)**: le pic spécifique du receveur chevauche le stutter n+1 du pic spécifique du donneur. Ces loci peuvent être utilisés si peu de loci informatifs sont disponibles et si la valeur de chimérisme du receveur attendue est supérieure à 5 %.

**Loci stutter (n-1)**: le pic spécifique du receveur chevauche le stutter n-1 du pic spécifique du donneur. Ces loci ne doivent être utilisés que si aucun autre locus informatif ou stutter (n+1) n'est disponible.

**REMARQUE**



L'utilisation des loci stutter (n-1) pour le suivi semi-quantitatif réduit la sensibilité en raison du chevauchement entre l'allèle spécifique du receveur et le stutter de l'allèle du donneur.

**Loci non informatifs**: loci pour lesquels le(s) pic(s) spécifique(s) du receveur chevauche(nt) le(s) pic(s) spécifique(s) du donneur, ou loci spécifiques au donneur.

## Analyse semi-quantitative – analyse du chimérisme

L'analyse semi-quantitative du chimérisme est réalisée conformément à la littérature, par ex. Clark et al. (2015) [15] ou Nollet et al. (2001) [16]. Les formules de quantification dépendent de la combinaisons allélique au niveau

du locus et sont présentées dans les Tableau 10 et Tableau 11 (adapté de Clark et al. [15]). La valeur de chimérisme est calculée pour chaque locus informatif préalablement sélectionné. La moyenne de toutes les valeurs de chimérisme spécifiques à chaque locus, ainsi que l'écart-type, est ensuite calculée. Un minimum de trois marqueurs informatifs doit être inclus dans le calcul du chimérisme afin d'atteindre la sensibilité la plus élevée. Il est recommandé d'utiliser des marqueurs informatifs spécifiques au patient pour toutes les plages de chimérisme mixte; à titre optionnel, les régions du marqueur n+1 spécifique au patient peuvent être analysées en complément pour les situations de chimérisme mixte moyen à élevé (> 5 %).

**REMARQUE**



L'évaluation de l'écart-type au sein des marqueurs ($SD_{Marker}$) est recommandée pour identifier les valeurs aberrantes. La valeur de $SD_{Marker}$ pour les échantillons de chimérisme mixte faible (< 5 % MC) ne doit pas dépasser 4 %. Pour les échantillons de chimérisme mixte moyen à élevé (> 5 % MC) la valeur de $SD_{Marker}$ ne doit pas dépasser 10 %. Si la valeur de $SD_{Marker}$ dépasse ces limites, il est recommandé de réanalyser les valeurs MC des marqueurs sélectionnés afin d'identifier d'éventuelles valeurs aberrantes.

**Tableau 10 Analyse semi-quantitative du chimérisme (adapté de Clark et al. [15]) – Scénario 1 et 2**

| Scénario 1 | Scénario 2 |
|---|---|
| **Aucun allèle partagé :** le receveur est homozygote, le donneur est hétérozygote, et aucun pic n'est partagé | **Aucun allèle partagé :** le receveur et le donneur sont tous deux hétérozygotes et aucun pic n'est partagé |

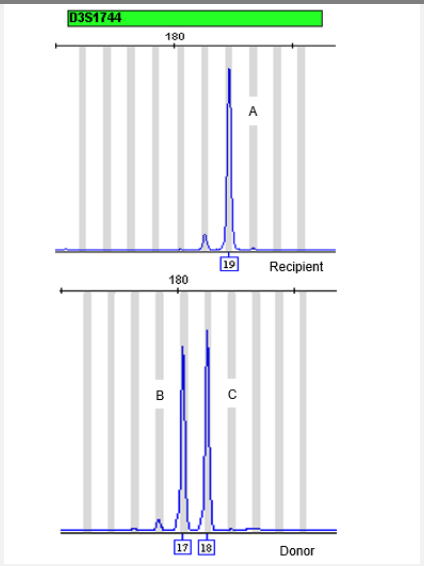
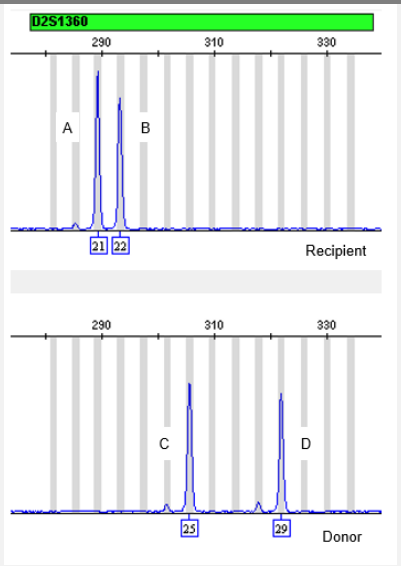
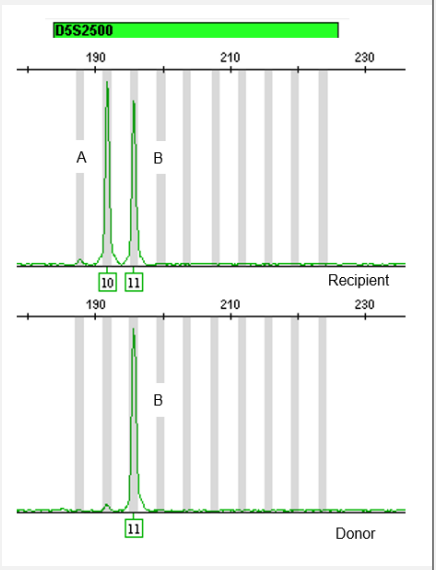
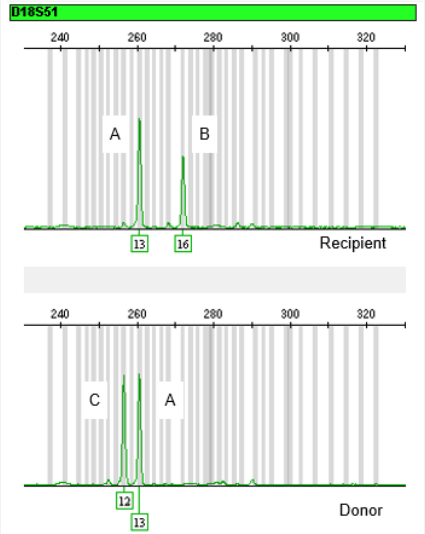
| Scénario 1 | Scénario 2 |
| --- | --- |
|  |  |
| **Ratio du receveur :**<br>$\%\ \text{chimerisme} = \frac{B+C}{A+B+C} \times 100\ \%$ | **Ratio du receveur :**<br>$\%\ \text{chimerisme} = \frac{A+B}{A+B+C+D} \times 100\ \%$ |

**Tableau 11 Analyse semi-quantitative du chimérisme (adapté de Clark et al. [15]) – Scénario 3 et 4**

| Scénario 3 | Scénario 4 |
|---|---|
| **Un allèle partagé (homozygote):** le receveur est hétérozygote, le donneur est homozygote, un pic est partagé | **Un allèle partagé (hétérozygote):** le receveur et le donneur sont tous deux hétérozygotes, un pic est partagé |
|  |  |
| **Ratio du receveur:**<br>$\% \text{ chimerisme} = \frac{A}{(\frac{(B - A)}{2}) - A} \times 100\%$ | **Ratio du receveur:**<br>$\% \text{ chimerisme} = \frac{B}{B + C} \times 100\ \%$ |

## 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 sous forme de graphiques et de tableaux.

Pour des instructions générales sur l'analyse des échantillons, se référer aux instructions d'utilisation du logiciel ChimerisMonitor IVD

Tous les modèles d'analyse requis sont inclus dans le système ***Gestion des kits de test (Test Kit Management)*** de ChimerisMonitor IVD. Celui-ci contient des méthodes d'analyse ainsi que des modèles Bin et Panel liés. Le logiciel effectue une évaluation générale et intégrée du run lors de l'importation par série (batch import), conformément au chapitre Validation du workflow de run. Voir Tableau 12 pour une description générale du workflow d'analyse des données de ChimerisMonitor IVD.

**REMARQUE**

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 des données, sans recourir à l'une des deux options logicielles décrites pour l'analyse et l'évaluation des données, n'est pas validée.

**Tableau 12 Workflow d'analyse du chimérisme avec ChimerisMonitor IVD**

| N° | Icône | 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 le Patient Management. |
| |  | ***Importation par série (Batch Import)***:<br>- Sélectionner le kit de test ***Biotype Mentype Chimera*** Tous les seuils permettant une évaluation correcte du run et des |

| N° | Icône | Étape de travail |
|---|---|---|
| | | échantillons sont liés à la méthode d'analyse correspondante.<br>- Importer un run contenant les fichiers fsa de l'échelle allélique, du contrôle positif, du contrôle sans matrice et des échantillons.<br>- Sélectionner manuellement les types d'échantillons (essentiel pour une attribution correcte des pics et un calcul fiable du chimérisme)<br>- L'évaluation générale du run et des échantillons est effectuée par le logiciel |
| |  | Ouvrir le ***Gestion de l'importation par série (Batch Import Management)*** |
| |  | ***Attribuer l'échantillon (Assign Sample)***:<br>Sélectionner un échantillon et l'attribuer au patient |
| 2 | Vérifier les contrôles – ChimerisMonitor IVD effectue une évaluation intégrée de la qualité ainsi qu'une évaluation du run et des échantillons | |
| |  | Vérifier l'***Électrophérogramme de l'échelle allélique (Allelic Ladder Electropherogram)*** et ***Régression de détermination de taille (Size Calling Regression)***<br>Des avertissements de qualité éventuels sont affichés :<br>- Dans l'onglet ***Évaluation des échelles alléliques (Evaluation of Allelic Ladders)*** pendant l'importation du batch<br>- Dans l'onglet ***Avertissements d'importation FSA (FSA Import Warnings)*** dans l'édition patient (Patient Editor) |
| |  | Vérifier l'***Électrophérogramme du contrôle positif (Positive Control Electropherogram)*** et ***Régression de détermination de taille (Size Calling Regression)***<br>L'***Évaluation des contrôles positifs et sans matrice (Evaluation of Positive and No Template Controls)*** pendant l'importation du batch affiche les avertissements de qualité éventuels. |
| |  | Vérifier l'***Électrophérogramme du contrôle sans matrice (No Template Control Electropherogram)*** et ***Régression de détermination de taille (Size Calling Regression)***<br>L'***Évaluation des contrôles positifs et sans matrice (Evaluation of Positive and No Template Controls)*** pendant l'importation du batchaffiche les avertissements de qualité éventuels |
| 3 | Évaluation des échantillons | |

| N° | Icône | 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 fiable du chimérisme.<br>Le contrôle ***Qualité de l'échantillon (Sample Quality)*** pendant l'importation par lot (Batch Import) affiche les avertissements de qualité éventuels<br>Vérifier la courbe de régression de détermination de taille Size Calling Regression de l'échantillon<br>Le contrôle ***Qualité de l'échantillon (Sample Quality)*** pendant l'importation par lot (Batch Import) affiche les avertissements de qualité éventuels |
| 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 du chimérisme | |
| |  | ***Calculer le chimérisme (Calculate Chimerism)***:<br>Voir les marqueurs présélectionnés pour l'analyse du chimérisme et effectuer le calcul du chimérisme (chimérisme par marqueur unique, chimérisme total et écart-type) |
| 6 | Rapport | |
| |  | ***Créer un rapport (Create Report)***:<br>Les valeurs individuelles et la cinétique du chimérisme sont affichées dans le temps (tableau et graphique, format de fichier pdf ou csv) |
| 7 | Constituer un système piloté par base de données pour la ***Gestion des patients (Patient Management)*** | |

## Analyse des données avec GeneMapper™ ID-X

### Préparation du GeneMapper™ ID-X logiciel

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

L'attribution des allèles doit être effectuée avec le logiciel d'analyse GeneMapper™ ID-X en association avec les fichiers modèles du kit

Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit provenant de BIOTYPE GmbH. Les BIOTYPE fichiers modèles (voir Tableau 13) sont disponibles sur notre page d'accueil (www.biotype.de/en/template-files) en téléchargement, ou sur demande via support@biotype.de. Le workflow d'analyse du chimérisme utilisant le logiciel GeneMapper™ ID-X est présenté dans le Tableau 14.

**Tableau 13 BIOTYPE GmbH modèles pour GeneMapperTM ID-X Software**

| Modèle | Nom du modèle | |
|---|---|---|
| Panels* | ChimeraIVD_Panel_v1x | ou versions ultérieures |
| Bin Sets* | ChimeraIVD_Bins_v1x | ou versions ultérieures |
| Size Standard* | BTO_60-550_v1x | ou versions ultérieures |
| Analysis Method* | ChimeraIVD_Analysis_v1x | ou versions ultérieures |
| Plot Settings | PlotsBT5_4dyes | |
| Table Settings | Table for 2 Alleles | |
| | Table for 10 Alleles | |
| Stutter# | ChimeraIVD_Stutter_v1x | ou versions ultérieures |

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

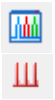
# Lors du chargement des panels mentionnés ci-dessus, les réglages de stutter ne sont pas acceptés. Les données de stutter doivent donc être importées séparément.

**REMARQUE**

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

**Tableau 14 Workflow d'analyse du chimérisme avec GeneMapperTM ID-X**

<table>
<tr><th>N°</th><th>Icône</th><th>Étape de travail</th></tr>
<tr><td>1</td><td colspan="2">Préparation du logiciel</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>Panel Manager<br>Importer les fichiers modèles fournis pour Panel, Bins, Stutter</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>GeneMapper™ ID-X Manager<br>Importer le modèle fourni pour Analysis Method et Size Standard</td></tr>
<tr><td>2</td><td colspan="2">Importation des échantillons</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>Ajouter des échantillons au projet (Add Samples to Project) - parcourir pour trouver le dossier du run, sélectionner, puis Ajouter à la liste (Add to List)</td></tr>
<tr><td>3</td><td colspan="2">Analyse des échantillons</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>Sélectionner les propriétés suivantes dans les colonnes appropriées de la feuille d'échantillons, puis choisir Analyser (Analyze).
<table>
<tr><th>Nom de la colonne</th><th>Sélectionner</th></tr>
<tr><td>Sample Type</td><td>Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control ou Sample</td></tr>
<tr><td>Analysis Method</td><td>Sélectionner le modèle précédemment importé<br>BIOTYPE GmbH templateChimeraIVD_Analysis_v1x</td></tr>
<tr><td>Panel</td><td>Sélectionner le modèle précédemment importé<br>BIOTYPE GmbH templateChimeraIVD_Panel_v1x</td></tr>
<tr><td>Size Standard</td><td>Sélectionner le modèle précédemment importé BIOTYPE GmbH template BTO_60-550_v1x</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>4</td><td colspan="2">Vérifier les contrôles</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>Vérifier la validité des contrôles (Allelic Ladder, Positive Control, No Template Control)</td></tr>
</table>

| N° | Icône | Étape de travail |
|---|---|---|
| | | Si les hauteurs de pic sont suffisantes, l'attribution est effectuée conformément aux spécifications de la méthode d'analyse |
| 5 | | Évaluation des échantillons |
| | | Vérifier la validité de l'échantillon. |
| |  | Si les hauteurs de pic sont suffisantes, l'attribution est effectuée conformément aux spécifications de la.méthode d'analyse<br><br>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 l'annexe Exemples d'évaluation qualitative des loci |
| 7 | | Analyse du chimérisme |
| |  | Exporter le tableau des tailles et calculer les valeurs de chimérisme conformément au Tableau 10 et Tableau 11 – Voir le chapitre Analyse semi-quantitative – analyse du chimérisme. |

**REMARQUE**

En utilisant les fichiers modèles fournis pour la méthode d'analyse, 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 apparaître sous forme d'indicateurs verts pour une validité réussie.



**REMARQUE**

Utiliser le Size Match Editor dans GeneMapper™ ID-X pour évaluer l'étalon de taille. En cas d'échec de l'attribution automatique des fragments, 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 à l'aide d'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 taille de fragments.

Si les résultats obtenus avec le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit doivent être harmonisés avec les résultats d'analyses cytologiques, s'assurer que ces analyses cytologiques ont été réalisées sur au moins 200 leucocytes.

**Pic de fuite**

Des pics de fuite peuvent apparaître si les hauteurs de pic se situent 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, il est recommandé de refaire la génération de la matrice et de vérifier une éventuelle surcharge en ADN.

**Pics de stutter**

L'apparition de pics de stutter dépend de la séquence de la structure répétée et du nombre d'allèles. Les pics N-4 sont causés par la perte d'une unité répétée lors de l'amplification des motifs STR tétranucléotidiques, en raison d'effets de glissement (slippage) de la Multi Taq 2 DNA Polymerase. L'interprétation de ces pics doit être réalisée conformément aux fichiers

modèles du logiciel GeneMapper™ ID-X . ChimerisMonitor IVD détecte les pics de stutter et ajuste automatiquement le nombre de loci informatifs.

**Artefacts**

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

Des artefacts tels que de petites taches de colorant (dye blobs) 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'amplicon est possible.

**Ajout de nucléotides indépendant de la matrice:**

En raison de son activité terminale transférase, la Multi Taq 2 DNA Polymerase a tendance à ajouter un résidu adénosine à l'extrémité 3' des fragments d'ADN amplifiés. Le pic d'artefact est plus court d'une base que prévu (pics à -1 bp). Toutes les amorces BIOTYPE sont conçues pour minimiser ces artefacts. La formation d'artefacts est en outre réduite par l'étape finale d'extension du protocole PCR à 68 °C pendant 60 min. La hauteur du pic d'artefact est corrélée à la quantité d'ADN. Les laboratoires doivent définir leurs propres limites pour l'analyse des pics.

**Écarts de pipetage**

L'analyse de robustesse du Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit a montré que le kit est robuste face à de légers écarts par rapport au protocole décrit (écart de +/- 10 %). Un écart moyen (+/- 20 %) par rapport au protocole expérimental décrit peut s'avérer plus critique pour l'analyse du chimérisme mixte (en particulier à de faibles pourcentages de chimérisme). Il est essentiel de porter une attention particulière au Reaction Mix A tampon PCR. Un écart de -20 % dans ce tampon peut entraîner une réduction significative de la hauteur du signal, voire des marqueurs non détectables. 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 ($SD_{Marker}$) est recommandée pour identifier les valeurs aberrantes. Si le $SD_{Marker}$ pour les échantillons de chimérisme mixte faible (< 5 % MC) dépasse 4 % et pour les échantillons de chimérisme mixte moyen à élevé (> 5 % MC) 10 %, veuillez envisager de réanalyser les valeurs MC sans cette valeur aberrante spécifique. Si moins de trois marqueurs devaient être analysés après exclusion de la valeur aberrante, veuillez répéter la PCR.

# Évaluation des performances

## Spécificité analytique

Nous avons testé l'attribution automatique des allèles à l'aide de l'échelle allélique, ainsi que la concordance de l'attribution des allèles par rapport au pré-typage des ADN testés au moyen d'autres méthodes (autres kits PCR, séquençage direct, et méthodes similaires), en utilisant le logiciel GeneMapper™ ID-X . Sur la base des résultats, les réglages spécifiques de l'appareil pour le génotypage par électrophorèse capillaire sur gel (bins et panels), ainsi que la proportion de pics de stutter pour l'analyse des modèles du Genetic Analyzer sont définis.

Nous avons évalué quatre-vingts échantillons d'ADN pré-caractérisés, analysés à l'aide du Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit. Des profils complets avec des hauteurs de pic ≥ 200 RFU ont été détectés. Après détermination des réglages spécifiques de l'appareil pour le test, le génotype correct a été attribué à tous les échantillons d'ADN pour tous les systèmes STR et le marqueur de l'amélogénine. De plus, nous avons calculé le pouvoir de discrimination (PD) pour chaque marqueur STR à l'aide des fréquences alléliques de tous les échantillons d'ADN analysés. Tous les marqueurs STR ont atteint un PD supérieur à 0.9, indiquant un pouvoir de discrimination élevé du Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit.

**Tableau 15 Pouvoir de discrimination (PD) basé sur les fréquences alléliques de quatre-vingts échantillons d'ADN**

| Marqueur | PD |
|---|---|
| AM | 0.4671 |
| D10S2325 | 0.9569 |
| D12S391 | 0.9569 |
| D18S51 | 0.9599 |
| D21S2055 | 0.9589 |
| D2S1360 | 0.928 |
| D3S1744 | 0.9109 |
| D4S2366 | 0.9116 |
| D5S2500 | 0.9287 |
| D6S474 | 0.9224 |
| D7S1517 | 0.9579 |
| D8S1132 | 0.9556 |
| SE33 | 0.9819 |

## 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 (3e édition), EP37 (1re édition). Pour le Mentype® Chimera® 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 n'ont montré aucun effet interférent de l'interférent endogène sang testé à 2.57E 003 % v/v dans la réaction PCR sur la mesure du profil complet d'un ADN à génotype unique. De plus, les écarts par rapport au groupe non traité observés pour les échantillons de chimérisme mixte mesurés à 2 %, 5 % et 30 % MC se situaient dans les limites d'exactitude et n'ont donc montré aucune interférence sur la réaction PCR. Cependant, une contamination sanguine peut être détectée visuellement dans la réaction

PCR ou dans la suspension d'ADN isolé par un changement de couleur vers l'orange. Si un changement de couleur est observé, nous recommandons de répéter l'isolement de l'ADN afin d'éviter toute interférence potentielle.

Pour les interférents exogènes, l'EDTA, l'éthanol, l'acide acétylsalicylique, le métoclopramide et la cyclosporine n'ont montré aucun effet d'interférence à leur $C_{max}$ respectif, où la mesure du profil complet de l'ADN à génotype unique 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 se situaient dans les limites d'exactitude.

En ce qui concerne les interférents exogènes citrate de sodium, héparine, protéinase K et méthotrexate, une interférence a été observée au $C_{max}$ recommandé par CLSI EP37 (1re édition). D'autres dilutions ont été testées jusqu'à ce qu'aucune interférence ne soit détectable. Pour le citrate de sodium, 8,23 x $10^{-6}$ % v/v; pour l'héparine, 36 x$10^{-2}$ mg/dL; pour la protéinase K, 3,22 x $10^{-6}$% v/v; et pour le méthotrexate, 6.8 mg/dL, aucune interférence n'a été observée.

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 estimons que le workflow 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 témoin de référence.

**Tableau 16 Concentrations testées des interférents endogènes et exogènes.**

| Type d'interférent | Catégorie | Interférent | Concentration non interférente |
|---|---|---|---|
| Endogène | Composants du sang total | Sang total | 2.57E- 003 % v/v dans la réaction PCR |
| Exogène | Anticoagulants | EDTA | 0.099 mg/dL |
| | | Citrate de sodium | 8,23 x $10^{-6}$ % v/v dans la PCR |
| | | Héparine | 2,36 x$10^{-2}$mg/dL |
| | Agents d'isolement de l'ADN | Protéinase K. | 3,13 x $10^{-4\%}$ v/v dans la réaction PCR |
| | | Éthanol | 2,70 x $10^{-3}$% v/v dans la réaction PCR |
| | Analgésiques et antipyrétiques | Aspirine (acide acétylsalicylique) | 3 mg/dL |
| | Agent antiémétique | Métoclopramide | 0.225 mg/dL |
| | Agent chimiothérapeutique | Méthotrexate | 6.8 mg/dL |
| | Agent immunosuppresseur | Ciclosporine | 0.18 mg/dL |

## Sensibilité analytique

L'ADNg humain à génotype unique est mesurable dans la plage de 0.125 ng à 2.00 ng. Dans cette plage, des profils complets de tous les marqueurs STR et de l'amélogénine peuvent être obtenus sans anomalie. Nous recommandons une quantité optimale de 0,50ng 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. Afin d'éviter les effets de saturation du signal avec des quantités d'entrée élevées ou une sensibilité restreinte avec des quantités d'entrée faibles, nous avons défini 1.00 ng d'ADN comme quantité optimale d'entrée pour la détection du chimérisme mixte.

La linéarité a été évaluée sur la base de la CLSI - EP06Ed2 (2nd édition). La linéarité a été testée à l'aide de six échantillons de chimérisme mixte différents. Les échantillons ont été choisis de manière à couvrir au moins une fois tous les marqueurs STR et l'amélogénine en tant que marqueur évaluable pour l'analyse du chimérisme mixte. Chaque échantillon de chimérisme mixte a été dilué pour couvrir un 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 2 % pour les échantillons présentant un chimérisme du receveur allant jusqu'à 5 %, afin de n'autoriser que des écarts mineurs dans cette plage. Pour un chimérisme du receveur > 5 %, l'ADL a été fixé à 10 % afin d'autoriser 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 sur la plage de mesure du chimérisme testée.

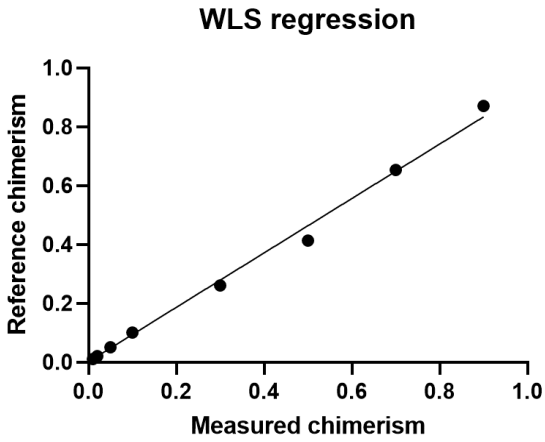



**Figure 2 Exemple de régression linéaire pondérée de différentes concentrations de chimérisme pour un même mélange de chimérisme.** La régression a montré un coefficient de détermination de 0.9947, confirmant un degré élevé de linéarité entre les valeurs mesurées et les valeurs attendues sur toute la plage de test de 1 % à 90 % de chimérisme du receveur

De plus, la linéarité de chaque marqueur individuel détectable avec le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit a été testée sur la plage de chimérisme du receveur de 1 % à 90 %. Tous les marqueurs présentent une linéarité acceptable sur l'ensemble de la plage.

La limite du 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 selon l'approche non paramétrique de la CLSI - EP17-A2 ($\alpha = 0.05$, 2nd édition). Seuls les marqueurs informatifs ont été analysés. Le résultat a confirmé une LOB nulle pour les deux lots.

En utilisant une quantité d'entrée d'ADN de 1.00 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. Seuls les marqueurs informatifs ont été analysés. En utilisant l'analyse Probit (CLSI - EP17-A2, 2nd édition) avec un niveau de confiance de 95 %, la limite de détection (LoD) en résultant était de 1.07 % pour le lot 1 et de 1.36 % pour le lot 2. La LoD reportable qui en résulte est de 1.36 % de chimérisme mixte. Lorsque des marqueurs informatifs ainsi que des

régions stutter n+1 sont utilisés pour l'analyse, la sensibilité de la LoD diminue jusqu'à 4.31 %.

Lorsque le minimum recommandé de trois marqueurs informatifs est utilisé, la limite de détection (LoD) résultante n'était pas compromise par rapport à la LoD obtenue en utilisant tous les marqueurs informatifs disponibles.

**Tableau 17 LoD pour le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit en utilisant les marqueurs informatifs**

| Lot | LoD (% de chimérisme mixte) | $N_{total}$ |
|---|---|---|
| Lot 1 | 1.36 % | 315 |
| Lot 2 | 1.07 % | 315 |

L'objectif de précision pour la limite de quantification a été défini conformément à la CLSI - EP17-A2 (2nd édition). Pour la détection du chimérisme à la LoD, nous avons défini l'objectif de précision à l'aide du modèle de Westgard (TE = IbiaisI + 1.96 s; (Westgard et al. 1974 [17])) ainsi que du biais et de la précision du dosage. Nous avons testé six échantillons de chimérisme mixte différents avec 2.00 % de chimérisme mixte à trois jours différents. L'écart-type poolé résultant, de 1.15 %, était inférieur à l'objectif de précision basé sur le TE de 1.59 %, confirmant une exactitude acceptable à la LoD.

## Exactitude

L'imprécision et le biais peuvent varier selon les différentes teneurs en chimérisme. Nous avons décidé de diviser la plage de chimérisme mixte (MC) en trois intervalles, également rapportés par Pettersson et al. (2021) [18], afin d'établir des critères d'acceptation adaptés à chaque intervalle. Les intervalles sont :

- Faible MC avec un contenu <5 % du second génotype
- Moyen MC avec un contenu de 5-20 % du second génotype
- Élevé MC avec un contenu >20 % du second génotype

L'analyse de l'exactitude a été basée sur la CLSI – EP21Ed2E (2nd édition). Le biais mesuré par comparaison avec un 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) [19]. L'erreur totale (Total Error) acceptable a été établie sur la base des estimations de biais de l'étude de linéarité et de l'imprécision rapportée pour les dosages PCR basés sur les STR pour l'analyse du chimérisme (Pettersson et al. 2021) [18]. Les valeurs sigma résultantes ont montré une bonne exactitude pour l'intervalle de MC faible et une excellente exactitude pour l'intervalle de MC moyen à élevé.

**Tableau 18 Valeurs sigma pour le chimérisme mixte**

| Échantillon | Valeur sigma |
|---|---|
| **2 % de chimérisme mixte** | 4.42 |
| **5 % de chimérisme mixte** | 5.21 |
| **30 % de chimérisme mixte** | 5.35 |

## Justesse

L'évaluation du biais a été basée sur des matériaux de référence provenant de trois fournisseurs de contrôles externes de qualité différents (3 programmes différents de contrôle externe de qualité). Le biais a été calculé pour la différence entre le résultat du Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit et la valeur de référence:

$$\Delta MC = Reference\ MC - Mentype\ Chimera\ MC$$

Le calcul du biais est basé sur la CLSI - EP09Ed3cE (3rd édition) et utilise la moyenne des valeurs ΔMC, la normalité de la distribution ayant été démontrée (test de normalité de Shapiro-Wilk, α = 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 se situait entre -0.42 et 0.11.

**Tableau 19 Biais (moyenne de ΔMC) pour un MC**

| | Faible MC (< 5 %) | Moyen MC (5-20 %) | Élevé MC (>20 %) |
|---|---|---|---|
| **Biais (moyenne de ΔMC)** | -0.18 | 0.11 | -0.42 |

Outre l'évaluation du biais, nous avons comparé le kit Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit à une méthode de référence. La méthode de référence, basée sur la PCR, du Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit analyse les polymorphismes DIP de l'ADN pour distinguer deux individus (génotypes). Les deux méthodes ont été mesurées sur 95 échantillons de patients représentant différentes teneurs de chimérisme mixte. Le coefficient de détermination résultant de 0.9665 a confirmé une forte corrélation entre les deux méthodes.

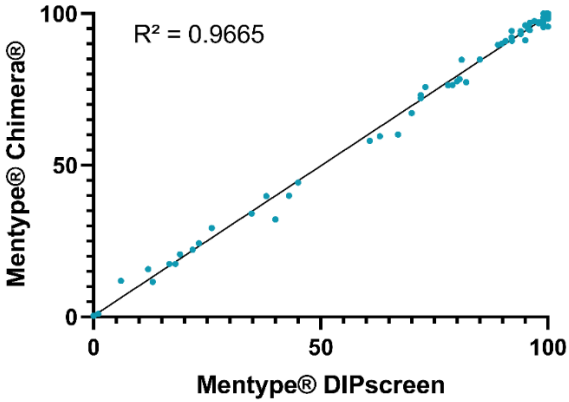



**Figure 3 Comparaison avec la méthode de référence du Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit et du Mentype® DIPscreen Kit. La régression linéaire présentée à droite montre une corrélation acceptable avec un coefficient de détermination de 0.9665**

## Répétabilité / Reproductibilité

Nous avons évalué la répétabilité et la reproductibilité du dosage sur la base de l'ISO 5725-2:2022-05 et de la CLSI - EP05 (3rd édition). Des échantillons de chimérisme mixte couvrant la plage de mesure du chimérisme (2 %, 5 %, 30 %, 70 %) ont été évalués dans une étude multisite 8 x 5 x 3 (jour x réplicat x site). L'étude s'est étalée sur plusieurs semaines dans un intervalle de deux mois afin de couvrir l'aspect suivi de l'analyse. La répétabilité résultante pour le chimérisme mixte se situait entre 0.63 % et 1.79 % d'écart-type (SD) de chimérisme mixte, et la reproductibilité entre 0.72 % et 1.80 % d'SD de chimérisme mixte.

## Seuil du test

Nous avons évalué le seuil du test pour le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit sur la base du calcul de la fréquence allélique des différents marqueurs amplifiés. Des échantillons d'environ 210 individus européens ont été réanalysés avec le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit. Les fréquences alléliques résultantes ont été utilisées pour calculer des paramètres de discrimination STR spécifiques, également pertinents pour l'analyse du chimérisme, tels que le contenu en information de polymorphisme (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. Le PD pour tous les marqueurs varie de 0.856 à 0.990, ce qui permet techniquement la discrimination de deux individus sur la base d'au moins un marqueur, mais le PD augmente lorsque plusieurs marqueurs sont utilisés en combinaison.

Dans l'ensemble, le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit permet une probabilité élevée de discrimination entre deux individus (à l'exception des jumeaux monozygotes) grâce à la variabilité des marqueurs, au potentiel informatif de chaque marqueur et à la combinabilité des différents marqueurs.

**Tableau 20 Probabilité de discrimination de tous les marqueurs inclus dans le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit. PIC, PD et HET ont été calculés pour chaque marqueur sur la base de l'analyse d'environ 210 individus européens**

| Marqueur | PIC | HET | PD |
|---|---|---|---|
| **D2S1360** | 0.820 | 0.955 | 0.856 |
| **D3S1744** | 0.790 | 0.792 | 0.943 |
| **D4S2366** | 0.760 | 0.795 | 0.919 |
| **D5S2500** | 0.780 | 0.804 | 0.938 |
| **D6S474** | 0.740 | 0.733 | 0.918 |
| **D7S1517** | 0.860 | 0.826 | 0.967 |
| **D8S1132** | 0.850 | 0.828 | 0.964 |
| **D10S2325** | 0.860 | 0.851 | 0.967 |

| Marqueur | PIC | HET | PD |
|---|---|---|---|
| D12S391 | 0.870 | 0.893 | 0.971 |
| D18S51 | 0.850 | 0.902 | 0.964 |
| D21S2055 | 0.870 | 0.856 | 0.971 |
| SE33 (ACTBP2) | 0.950 | 0.949 | 0.990 |
| MIN | 0.740 | 0.733 | 0.856 |
| MAX | 0.950 | 0.955 | 0.990 |

## Stabilité en cours d'utilisation

Toutes les études de stabilité ont été planifiées conformément à la norme ISO 23640:2015 et à la ligne directrice CLSI EP25. La procédure suivante a été appliquée pour toutes les études de stabilité: le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit a été testé à plusieurs points dans le temps sur différentes durées. L'analyse des échantillons de chimérisme a été réalisée à l'aide du 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 à une quantité d'entrée d'ADN de 0.5 ng et des échantillons de chimérisme mixte (MC) de XY1726:XX1180 (receveur:donneur) à une quantité d'entrée d'ADN de 1 ng, représentant les différents intervalles de MC de 2 %, 5 % et 30 % de MC. Pour le calcul du chimérisme du receveur du mélange XY1726:XX1180, 7 marqueurs informatifs et stutter n+1 évaluables ont été utilisés.

L'évaluation finale des différentes conditions comprenait la comparaison entre les moyennes du point de départ ($t_0$) et des différents points dans le temps ($t_n$) 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, deux expériences ont été réalisées. La première pour tester la stabilité après exposition à des cycles de congélation-décongélation, et la seconde pour tester la stabilité des kits lors d'une utilisation simulée après ouverture. Tous les échantillons testés dans l'expérience de stabilité en cours d'utilisation ont présenté un profil complet de marqueurs pour l'ADN à génotype unique XY1726 et se situaient en dessous des limites d'exactitude et de précision basées sur l'erreur totale

du dosage pour les trois échantillons de MC testés: 30 %, 5 %, 2 % de MC, avec leurs limites respectives de 3.14 %, 1.99 % et 1.59 %.

Sur la base des résultats, le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit est stable après sa première ouverture jusqu'à la fin de sa durée de conservation, ainsi que stable pour un maximum de 20 cycles de congélation-décongélation.

## Données de performance clinique

### Conception de l'étude, aspects éthiques et réglementaires

Le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit et les méthodes de référence ont été testés sur des échantillons de patients après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-HSCT). Les 10 patients inclus dans cette étude ont été suivis après allo-HSCT, et la teneur en cellules du donneur des échantillons a été analysée 10 fois au cours du suivi après allo-HSCT. L'objectif de cette étude était de fournir des preuves cliniques conformément aux §§ 20 à 24 de la loi sur les dispositifs médicaux «Medizinproduktgesetz» (MPG version du 7 août 2002 (BGBI. I S 3146). En utilisant la méthode cytogénétique de référence FISH, une concordance avec la méthode PCR basée sur les STR 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, l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) a été réalisée à l'aide du kit de sondes ADN fluorescentes marquées directement spécifiques des allosomes CE-IVD 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 sexes différents ont été incluses dans l'étude. Seuls les résultats cytogénétiques avec un nombre de cellules > 200 ont été évalués, conformément aux recommandations du fabricant.

**Extraction et purification de l'ADN**

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

**Résultats**

La forte corrélation entre le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit et la méthode cytogénétique de référence, avec $R^2$ = 0.9504, confirme l'applicabilité pour le suivi du chimérisme après allo-HSCT.

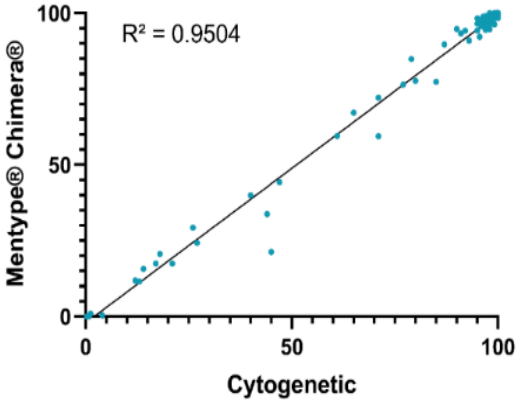



**Figure 4 La corrélation entre les résultats cytogénétiques et ceux du Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit est présentée dans le graphique. La régression linéaire montre une corrélation acceptable avec un coefficient de détermination de 0.9504 (N = 93)**

La concordance obtenue de 94.62 % (5 % ΔMC accepté) avec les résultats de la méthode de référence confirme la fiabilité du Mentype® Chimera® 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) [20]. Les paramètres

d'évaluation des performances cliniques selon l'Annexe I, Sec. 9.1b de l'IVDR se sont révélés ne pas être entièrement applicables au Mentype® Chimera® 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 21 Caractéristiques diagnostiques**

| Caractéristiques diagnostiques | Estimation |
|---|---|
| Sensibilité diagnostique | 83 % |
| Spécificité diagnostique | 92 % |
| Exactitude diagnostique | 84 % |
| Valeur prédictive positive | 98 % |
| Valeur prédictive négative | 52 % |
| Prévalence | 83 % |

# Contrôle qualité

Tous les composants du kit font l'objet d'un processus d'assurance qualité rigoureux chez BIOTYPE GmbH. La qualité du kit de test est surveillée en permanence afin de garantir qualité et la conformité du kit. Veuillez nous contacter pour toute question relative à l'assurance qualité.

# Assistance technique

Pour toute assistance technique, veuillez contacter notre équipe support:

**e-mail**: support@biotype.de

**Téléphone** : +49 (0)351 8838 400

# Références

[1] Thiede, C., Florek, M., Bornhäuser, M., Ritter, M., Mohr, B., Brendel, C., ... & Neubauer, A. (1999). Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. Bone Marrow Transplantation, 23(10), 1055-1060.

[2] Lion, T., Watzinger, F., Preuner, S., Kreyenberg, H., Tilanus, M., de Weger, R., ... & Bader, P. (2012). The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. Leukemia, 26(8), 1821-1828.

[3] Thiede, C. (2004). Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. American Journal of Pharmacogenomics, 4, 177-187.

[4] Becker, D., Bender, K., Edelmann, J., Götz, F., Henke, L., Hering, S., ... & Brabetz, W. (2007). New alleles and mutational events at 14 STR loci from different German populations. Forensic Science International: Genetics, 1(3-4), 232-237.

[5] Thiede, C., Bornhäuser, M., & Ehninger, G. (2004). Evaluation of STR informativity for chimerism testing–comparative analysis of 27 STR systems in 203 matched related donor recipient pairs. Leukemia, 18(2), 248-254.

[6] Wiegand, P., & Klintschar, M. (2002). Population genetic data, comparison of the repeat structure and mutation events of two short STRs. International journal of legal medicine, 116, 258-261.

[7] Wiegand, P., Schneider, H. R., Schürenkamp, M., Kleiber, M., & Brinkmann, B. (1998). Tetranucleotide STR system D8S1132: sequencing data and population genetic comparisons. International journal of legal medicine, 111, 180-182.

[8] Hering, S., & Müller, E. (2001). New alleles and mutational events in D12S391 and D8S1132: sequence data from an eastern German population. Forensic science international, 124(2-3), 187-191.

[9] Wiegand, P., Lareu, M. V., Schürenkamp, M., Kleiber, M., & Brinkmann, B. (1999). D18S535, D1S1656 and D10S2325: three efficient short tandem repeats for forensic genetics. International journal of legal medicine, 112, 360-363.

[10] Lareu, M. V., del Carmen Pestoni, M., Barros, F., Salas, A., & Carracedo, A. (1996). Sequence variation of a hypervariable short tandem repeat at the D12S391 locus. Gene, 182(1-2), 151-153.

[11] Barber, M. D., & Parkin, B. H. (1996). Sequence analysis and allelic designation of the two short tandem repeat loci D18S51 and D8S1179. International journal of legal medicine, 109, 62-65.

[12] Henke, L., Muche, M., Blaauw, A., Van Eede, P. H., Martin, W., Helmken, C., ... & Henke, J. (2007). Validation of a" new" short tandem repeat (STR) fluorescent multiplex system and report of population genetic data. Clinical Laboratory, 53(7-8), 477-482.

[13] Schmid, D., Anslinger, K., & Rolf, B. (2005). Allele frequencies of the ACTBP2 (= SE33), D18S51, D8S1132, D12S391, D2S1360, D3S1744, D5S2500, D7S1517, D10S2325 and D21S2055 loci in a German population sample. Forensic science international, 151(2-3), 303-305.

[14] Urquhart, A., Kimpton, C. P., & Gill, P. (1993). Sequence variability of the tetranucleotide repeat of the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2) locus. Human genetics, 92(6), 637-638.

[15] Clark, J. R., Scott, S. D., Jack, A. L., Lee, H., Mason, J., Carter, G. I., ... & Barnett, D. (2015). 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(1), 26-37.

[16] Nollet, F., Billiet, J., Selleslag, D., & Criel, A. (2001). Standardisation of multiplex fluorescent short tandem repeat analysis for chimerism testing. Bone marrow transplantation, 28(5), 511-518.

[17] Westgard, J. O., Carey, R. N., & Wold, S. (1974). Criteria for judging precision and accuracy in method development and evaluation. Clinical chemistry, 20(7), 825-833.

[18] 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, 512, 40-48.

[19] Westgard, J. O., Bayat, H., & Westgard, S. A. (2018). Planning risk-based SQC schedules for bracketed operation of continuous production analyzers. Clinical Chemistry, 64(2), 289-296.

[20] 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 ce mode d'emploi doivent être suivies telles que décrites. Tout écart peut entraîner un échec du dosage ou provoquer 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 adéquates de prélèvement, de transport, de stockage et de traitement des échantillons sont requises pour une performance optimale de ce test.
- Le kit n'a été validé que pour une utilisation avec des échantillons de sang total veineux périphérique humain analysés sur les instruments PCR répertoriés dans le chapitre Instruments et logiciels
- Ce dosage 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 dosage. Le kit n'a été validé qu'avec les kits décrits dans le chapitre Réactifs, kits et consommables pour l'extraction et la purification de l'ADN.
- De 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 les résultats 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® Chimera® 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 locus STR et les locus spécifiques du sexe.
- Ne pas utiliser de composants périmés ou incorrectement conservés.
- L'analyse du chimérisme a été validée à l'aide de marqueurs informatifs spécifiques au patient (pour toutes les plages de chimérisme) ou, en option, des régions de marqueurs n+1 spécifiques au patient ont été sélectionnées pour les échantillons de chimérisme mixte moyen à élevé (> 5 %). L'utilisation de marqueurs n-1 ou non informatifs n'est pas prise en charge.
- Les échantillons provenant de différents groupes ethniques peuvent présenter des caractéristiques génétiques distinctes, telles que des fréquences alléliques différentes, ce qui pourrait limiter le pouvoir de discrimination ou l'amplification. La fréquence allélique des marqueurs STR a été évaluée dans plusieurs populations. Le pouvoir de discrimination combiné d'au moins deux marqueurs 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. Cependant, les données de population sont actuellement disponibles pour les groupes caucasiens et asiatiques. L'impact potentiel pour d'autres groupes ethniques ne peut pas être estimé.

  En raison de la variabilité génétique, les microsatellites tels que les polymorphismes nucléotidiques uniques (SNPs) peuvent affecter l'efficacité des amorces ou l'accessibilité de la matrice. Cependant, une analyse de la version la plus récente de l'assemblage du génome humain (HG38) n'a révélé aucun SNPs cliniquement pertinent dans toutes les populations.

# Informations de commande

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

| Produit | Taille du conditionnement | Numéro de commande |
|---|---|---|
| Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit | 25 réactions<br>100 réactions<br>400 réactions | 45-12200-0025<br>45-12200-0100<br>45-12200-0400 |
| Matrix Standards BT5 multi | 1 x 25 µL<br>2 x 25 µL | 45-15100-0025<br>45-15100-0050 |
| ChimerisMonitor IVD | licence de démonstration<br>Licence d'un an<br>Licence de 3 ans | <br>46-14800-0000<br> |

**REMARQUE**

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

# Marques et avis de non-responsabilité

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

Autres marques: ABI PRISM®, GeneMapper™, GeneAmp® et Applied Biosystems™ (Applied Biosystems LLC group); QIAamp® (Qiagen); POP4™ (Europe: Applied Biosystems LLC, États-Unis: Life Technologies Corporation). La PCR est couverte 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.

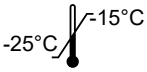
Le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit est un dispositif de diagnostic marqué CE conformément au règlement européen relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro (UE) 2017/746.

Le produit n'est pas homologué par Health Canada et n'est pas approuvé ni autorisé 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 le mode d'emploi 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 |
|  | À conserver au sec |
|  | Identifiant unique du dispositif |

Autres marquages utilisés dans ce mode d'emploi:

| | |
|---|---|
|  | Conseils utiles |
|  | Attention, veillez à respecter cette consigne ! |
| texte souligné bleu | Liens menant vers du contenu externe tel que des pages d'accueil, des adresses e-mail |
| texte souligné noir | Renvois dans le document pour faciliter la navigation |
| ***texte en retrait, en italique, en gras*** | Champs sur lesquels cliquer dans un logiciel |

# Annexe

## Électrophérogrammes des échantillons de référence

Vous trouverez sur les pages suivantes des exemples d'électrophérogrammes de l'Mentype® Chimera® Allelic Ladder (Figure 5), du Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 (PC, Figure 6) et d'un témoin sans matrice (NTC, Figure 7).

Tous les échantillons ont été amplifiés sur un ProFlex PCR cycleur et analysés sur un Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer (POP-4™, capillaire de 36 cm) selon les paramètres de run validés. L'analyse des données a été réalisée à l'aide de GeneMapper™ ID-X version 1.6. Les modèles de Bins, Panels, Stutter et méthodes d'analyses selon le Tableau 13 ont été appliqués.

Les électrophérogrammes sont zoomés sur une longueur de fragment de 70 à 480 pb (axe X). La plage générale pour l'analyse de la longueur de fragment (axe X) avec le Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit est de 50 pb à 550 pb. La mise à l'échelle de l'axe Y a été réalisée individuellement selon la description figurant sous chaque figure (voir Figure 5, Figure 6, Figure 7)

## Mentype® Chimera® Allelic Ladder

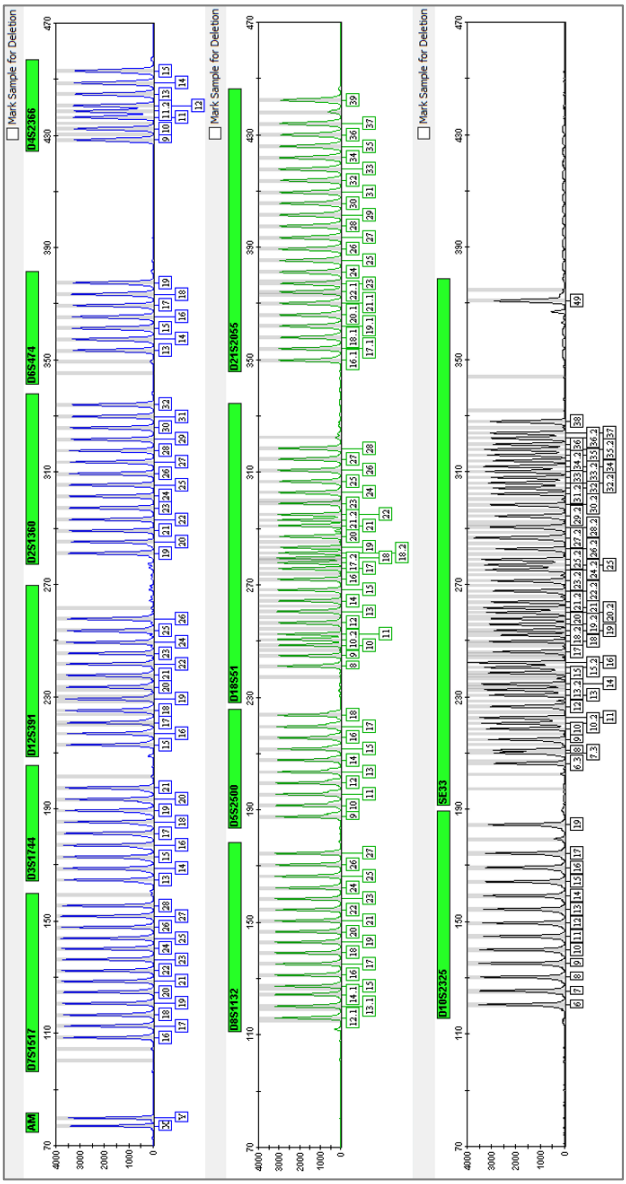



**Figure 5 Mentype® Chimera® Allelic Ladder**
Zoom sur 4 000 RFU (axe Y) et 70 à 450 pb (axe X)

## Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 (PC)

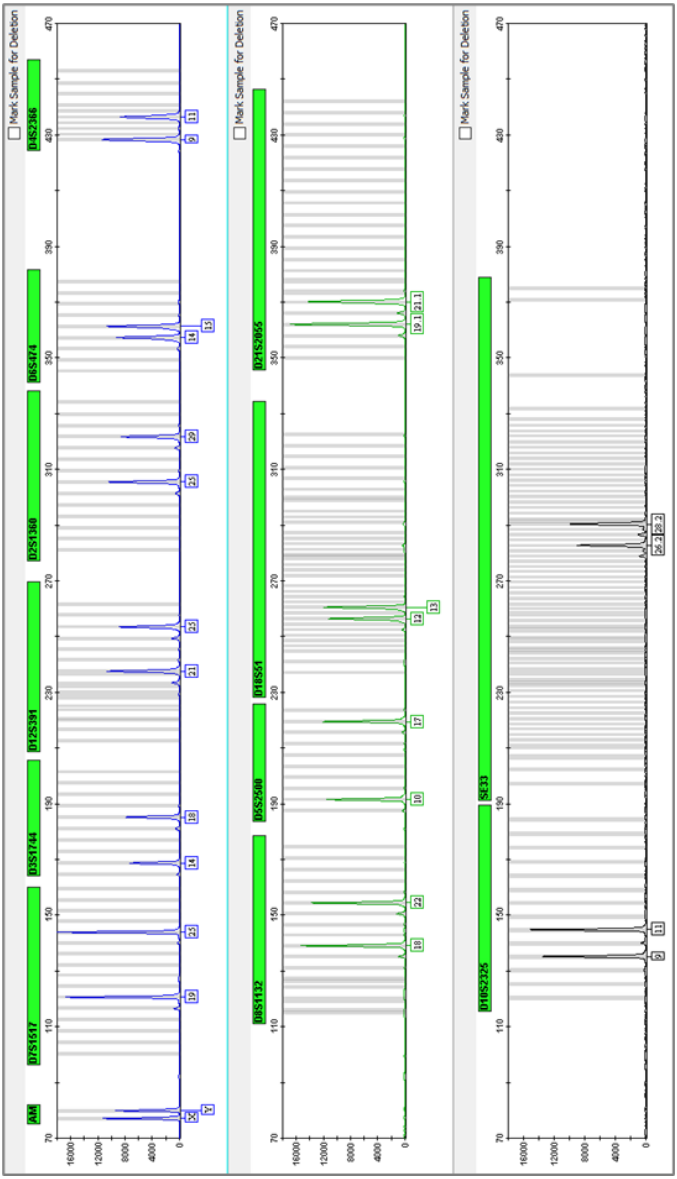



**Figure 6 Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 (PC)**
Zoom sur 18 000 RFU (axe Y) et 70 à 450 pb (axe X)

**Témoin sans matrice (NTC)**




**Figure 7 Témoin sans matrice (NTC) Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit.** Zoom sur 2 000 RFU (axe Y) et 70 à 450 pb (axe X)

## Longueurs des fragments et des allèles

Les Tableau 22 à Tableau 24 indiquent les longueurs de fragments des allèles individuels, en référence à l'DNA Size Standard 550 (BTO). Toutes les analyses ont été réalisées sur un ABI PRISM® 310/3130 Genetic Analyzer avec le polymère POP-4™ . Différents instruments d'analyse, étalons de taille d'ADN ou polymères peuvent entraîner des longueurs de fragments différentes. De plus, un alignement visuel avec l'échelle allélique est recommandé.

Annotations dans les Tableau 22 à Tableau 24:

* arrondi à l'entier

** Les allèles « off-ladder » du pool d'ADN de BIOTYPE' sont attribués aux fichiers modèles actuels de BIOTYPE pour GeneMapper™ ID-X. Pour d'autres allèles, voir notamment https://strbase.nist.gov/

‡ Pour une meilleure orientation, ces allèles sont mis en évidence dans l'échelle allélique

**Tableau 22 Longueurs de fragments de la Mentype® Chimera® Allelic Ladder analysée sur un ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer avec le polymère POP-4™ (panel bleu)**

| Marqueur/ allèle | Taille [pb]* | Autres allèles** | Marqueur/ allèle | Taille [pb]* | Autres allèles** | Marqueur/ allèle | Taille [pb]* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Amelogenin** | **6-FAM** | | **D12S391** | **6-FAM** | | **D6S474** | **6-FAM** |
| X | 77 | | 15 | 213 | | 13 | 354 |
| Y | 80 | | 16 | 217 | 16.3 | 14 | 358 |
| | | | 17 | 221 | 17.3 | 15 | 362 |
| **D7S1517** | **6-FAM** | | 18 | 226 | 18.3 | 16 | 366 |
| 16 | 108 | 14, 15 | 19 | 230 | 19.1, 19.3 | 17 | 370 |
| 17 | 112 | | 20 | 234 | 20.3 | 18 | 374 |
| 18 | 116 | | 21 | 238 | | 19 | 378 |
| 19 | 120 | | 22 | 242 | | | |
| 20 | 124 | | 23 | 246 | | **D4S2366** | **6-FAM** |
| 21 | 128 | | 24 | 250 | | 9 | 429 |
| 22 | 132 | | 25 | 254 | | 10 | 433 |
| 23 | 136 | | 26 | 258 | 27 | 11 | 437 |
| 24 | 140 | | | | | 11.2 | 440 |
| 25 | 144 | | **D2S1360** | **6-FAM** | | 12 | 441 |
| 26 | 148 | | 19 | 281 | | 13 | 445 |
| 27 | 152 | | 20 | 285 | | 14 | 449 |
| 28 | 155 | 29 | 21 | 289 | | 15 | 454 |
| | | | 22 | 293 | | | |
| **D3S1744** | **6-FAM** | | 23 | 297 | | | |
| 13 | 165 | | 24 | 302 | | | |
| 14 | 169 | | 25 | 306 | | | |
| 15 | 173 | | 26 | 310 | | | |
| 16 | 177 | | 27 | 314 | | | |
| 17 | 182 | | 28 | 318 | | | |
| 18 | 186 | | 29 | 322 | | | |
| 19 | 190 | | 30 | 326 | | | |
| 20 | 194 | | 31 | 330 | | | |

| Marqueur/ allèle | Taille [pb]* | Autres allèles** | Marqueur/ allèle | Taille [pb]* | Autres allèles** | Marqueur/ allèle | Taille [pb]* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 21 | 198 | 22 | 32 | 334 | | | |

**Tableau 23 Longueurs de fragments de la Mentype® Chimera® Allelic Ladder analysée sur un ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer avec le polymère POP-4™ (panel vert)**

| Marqueur/allèle | Taille [pb]* | Autres allèles** | Marqueur/allèle | Taille [pb]* | Autres allèles** | Marqueur/allèle | Taille [pb]* | Autres allèles** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **D8S1132** | **BTG** | | **D18S51** | **BTG** | | **D21S2055** | **BTG** | |
| 12.1 | 117 | 12, 13 | 8 | 241 | 7 | 16.1 | 351 | |
| 13.1 | 121 | | 9 | 245 | 9.2 | 17.1 | 355 | |
| 14.1 | 125 | 14.3 | 10 | 249 | | 18.1 | 359 | |
| 15 | 128 | | 10.2 | 251 | | 19.1 | 363 | |
| 16 | 132 | | 11 | 253 | 11.2 | 20.1 | 367 | |
| 17 | 136 | | 12 | 257 | 12.2 | 21.1 | 371 | |
| 18 | 140 | | 13 | 261 | 13.2 | 22.1 | 375 | 22 |
| 19 | 144 | | 14 | 264 | 14.2 | 23 | 378 | 23.1 |
| 20 | 148 | | 15 | 268 | | 24 | 382 | |
| 21 | 151 | | 16 | 272 | 16.2 | 25 | 386 | |
| 22 | 155 | | 17 | 276 | | 26 | 390 | |
| 23 | 159 | | 17.2 | 278 | 17.3 | 27 | 395 | |
| 24 | 163 | | 18 | 279 | | 28 | 399 | |
| 25 | 167 | | 18.2 | 281 | | 29 | 403 | |
| 26 | 171 | | 19 | 283 | 19.2 | 30 | 406 | |
| 27 | 175 | | 20 | 287 | | 31 | 411 | |
| | | | 21 | 291 | | 32 | 415 | |
| **D5S2500** | **BTG** | | 21.2 | 293 | | 33 | 419 | |
| 9 | 188 | | 22 | 295 | | 34 | 423 | |
| 10 | 192 | | 23 | 299 | 23.1 | 35 | 427 | |
| 11 | 196 | | 24 | 302 | | 36 | 431 | |
| 12 | 200 | | 25 | 306 | | 37 | 435 | 38 |
| 13 | 204 | | 26 | 310 | | 39 | 443 | |
| 14 | 208 | | 27 | 314 | | | | |
| 15 | 212 | | 28 | 318 | 29 | | | |
| 16 | 216 | | | | | | | |

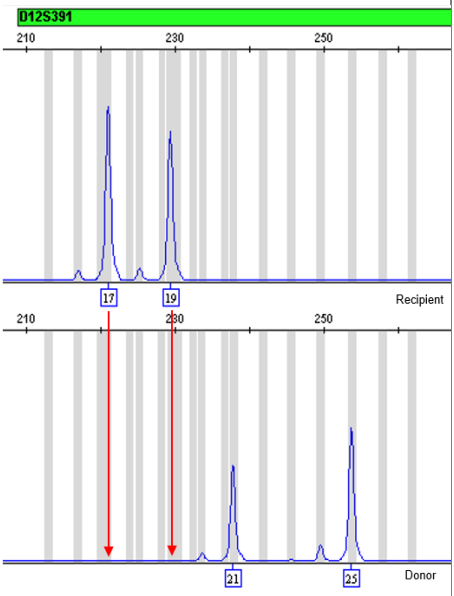
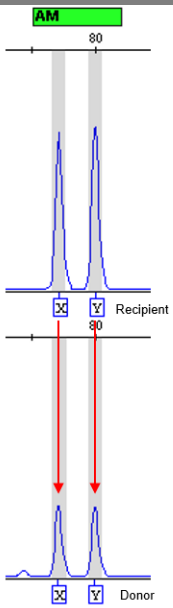
| Marque ur/allèle | Taille [pb]* | Autres allèles** | Marque ur/allèle | Taille [pb]* | Autres allèles** | Marque ur/allèle | Taille [pb]* | Autres allèles** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 17 | 220 | | | | | | | |
| 18 | 224 | | | | | | | |

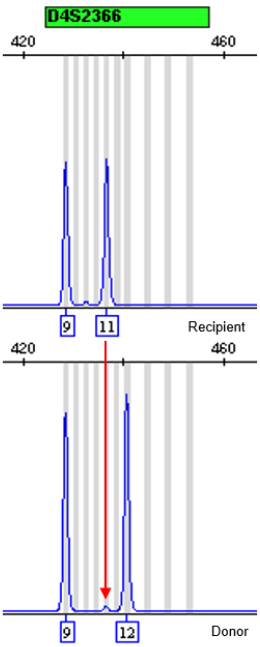
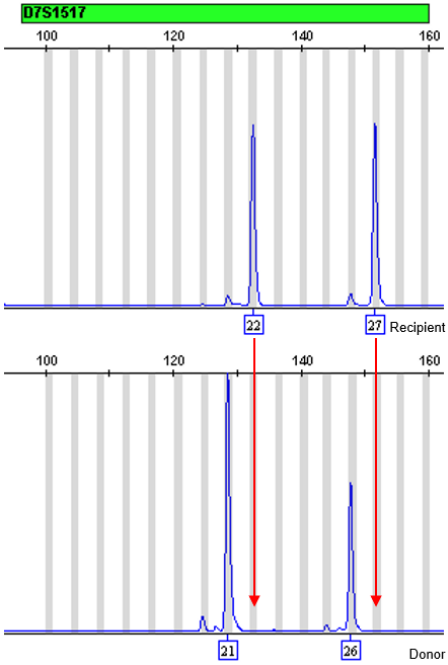
**Tableau 24 Longueurs de fragments de la Mentype® Chimera® Allelic Ladder analysée sur un ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer avec le polymère POP-4™ (panel jaune)**

| Marque ur/allèle | Taille [pb]* | Autres allèles** | Marque ur/allèle | Taille [pb]* | Autres allèles** | Marque ur/allèle | Taille [pb]* | Autres allèles** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **D10S2325** | **BTY** | | **SE33** | **BTY** | | **SE33** | **BTY** | |
| 6 | 121 | | 6.3 | 205 | 4.2, 5.3 | 25.2 | 278 | |
| 7 | 126 | | 7.3 | 209 | 7 | 26.2 | 282 | 26 |
| 8 | 131 | | 8 | 210 | 8.2 | **27.2‡** | **285** | 27 |
| 9 | 136 | | 9 | 214 | 9.2 | 28.2 | 289 | 28, 28.3 |
| 10 | 141 | | 10 | 218 | | 29.2 | 293 | 29 |
| 11 | 145 | | 10.2 | 220 | | 30.2 | 297 | 30 |
| 12 | 150 | | 11 | 222 | 11.2 | 31.2 | 301 | 31 |
| 13 | 155 | | 12 | 226 | 12.2 | 32 | 303 | |
| 14 | 160 | | 13 | 230 | | 32.2 | 305 | |
| 15 | 165 | | 13.2 | 232 | 13.3 | 33 | 307 | |
| 16 | 170 | | 14 | 234 | 14.2, 14.3 | 33.2 | 309 | |
| 17 | 175 | 18 | 15 | 238 | | 34 | 311 | |
| 19 | 185 | | 15.2 | 240 | | 34.2 | 313 | |
| | | | **16‡** | **241** | 16.2, 16.3 | 35 | 315 | |
| | | | 17 | 245 | 17.2, 17.3 | 35.2 | 317 | |
| | | | 18 | 249 | | 36 | 318 | |
| | | | 18.2 | 251 | 18.3 | 36.2 | 321 | |
| | | | 19 | 253 | | 37 | 322 | 37.2 |
| | | | 19.2 | 255 | | **38** | **326** | **39, 42** |
| | | | 20 | 257 | 20.1 | 49 | 369 | 50 |
| | | | 20.2 | 259 | | | | |
| | | | 21 | 261 | | | | |
| | | | 21.2 | 263 | 22 | | | |
| | | | 22.2 | 267 | | | | |
| | | | 23.2 | 270 | 23 | | | |
| | | | 24.2 | 274 | 24 | | | |
| | | | 25 | 276 | | | | |

# Exemples d'évaluation qualitative des loci

### Tableau 25 Exemples d'évaluation qualitative des loci

| Loci informatifs | Loci non informatifs |
|---|---|
|  |  |

| Stutter n-1 | Stutter n+1 |
| --- | --- |
|  |  |

**BIOTYPE GmbH**
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY
Tél.: +49 351 8838 400
Fax: +49 351 8838 403
www.biotype.de

**Commandes**
sales@biotype.de

**Service client et assistance technique**
support@biotype.de