

Mentype[®] Chimera[®]

PCR Amplification Kit

Návod k použití (IFU)



0483

Diagnostika in vitro

CHNIFU02v1cz

17.01.2025

REF

45-12200-0025

45-12200-0100

45-12200-0400

LOT

Šarže



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

Webové stránky: www.biotype.de

E-mail: support@biotype.de

Objednávka: sales@biotype.de



Oznámení o změně

Vezměte prosím na vědomí následující změny oproti předchozí verzi návodu k použití:

Číslo dokumentu	Změny	Datum
CHNIFU02v1cz	Původní verze	17.01.2025

Tištěnou verzi tohoto návodu k použití vám můžeme poskytnout zdarma do 7 dnů.

V případě těchto nebo jiných dotazů nás prosím kontaktujte na čísle:

+49 351 8838 400 nebo support@biotype.de

Obsah

Určené použití	4
Vědecké pozadí	4
Popis produktu.....	5
Dodávané materiály	7
Obsah sady	7
Popis činidel	8
Skladování činidel a manipulace s nimi	9
Potřebné, ale nedodané materiály	9
Všeobecné laboratorní vybavení.....	9
Činidla, sady a spotřební materiál.....	10
Přístroje a software	11
Vzorky	12
Upozornění a bezpečnostní pokyny	12
Poznámka pro uživatele	13
Postup.....	14
Přehled experimentálního pracovního postupu	14
Příprava vzorku	14
Požadavky na výchozí materiál	14
Extrakce DNA	15
Kvantifikace a ředění DNA	15
Skladování DNA	16
Příprava kontrolních vzorků	16
Pozitivní kontrola PC	16
Kontrola bez templátu NTC	17
Příprava master mixu	17
Amplifikace PCR	19
Kapilární gelová elektroforéza.....	20
Příprava produktů PCR	20

Analýza délky fragmentu	21
Analýza dat	23
Obecný postup analýzy dat	23
Průběh postupu validace	24
DNA Size Standard 550 (BTO).....	25
Mentype® Chimera® Allelic Ladder	25
Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 (PC)	26
No Template Control NTC	26
Analýza vzorků	27
Proces analýzy dat	27
Kvalitativní analýza – identifikace informativních lokusů	28
Semikvantitativní analýza – analýza chimérismu.....	29
Analýza dat pomocí ChimerisMonitor IVD	32
Analýza dat pomocí GeneMapper™ ID-X	34
Příprava GeneMapper™ ID-X Software	34
Řešení problémů.....	37
Hodnocení výkonu.....	39
Kontrola kvality	52
Technická podpora	52
Reference.....	52
Omezení používání	54
Informace k objednávce	56
Ochranné známky a prohlášení o vyloučení odpovědnosti	57
Vysvětlení symbolů	58
Dodatek.....	60

Určené použití

Sada Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit je manuální analýza pro sledování chimérismu u dospělých pacientů s leukémií, kteří podstoupili alogenní transplantaci krvetvorných buněk (allo-HSCT). K tomuto účelu se používá genomová DNA získaná ze vzorků periferní žilní plné krve. Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit detekuje 12 polymorfismů krátkých tandemových repetic (STR) a polymorfismus delece a inserce (DIP) amelogeninu v multiplexní PCR reakci. Tyto polymorfismy se používají ke kvalitativní detekci genotypů pacienta a dárce, aby bylo možné identifikovat STR alely specifické pro pacienta před hodnocením chimérismu. Po alo-HSCT se analyzují informativní alely specifické pro pacienta, aby bylo možné provést semikvantitativní analýzu chimérismu.

Sada Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit je určena pro profesionální laboratorní uživatele, kteří jsou vyškoleni v molekulárně genetických technikách, multiplexní PCR a v používání genových analyzátorů Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems™).

Vědecké pozadí

Alogenní transplantace krvetvorných buněk (allo-HSCT) je léčebnou metodou pro pacienty s nenádorovými a zhoubnými hematologickými onemocněními, jako je například leukémie. Analýza chimérismu se používá ke stanovení směsi dárcovských a příjemcových krvetvorných buněk u příjemců alo-HSCT s cílem odhalit časně známky rejekce transplantátu. Pro genotypizaci a monitorování se používá lidská periferní žilní krev. Podle pokynů CLSI (MM05-A2, 2. vydání) se pro odběr krve doporučují antikoagulant jako EDTA a citrát. V závislosti na úspěšnosti transplantace se mohou vyvinout různé formy hematopoetického chimérismu (kompletní, smíšený nebo ztrátový). K analýze chimérismu se používají různé metody, včetně fluorescenční in situ hybridizace (FISH), polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP), analýzy krevního obrazu a metod založených na PCR. V současné době je zlatým standardem pro analýzu chimérismu amplifikace STR polymorfismů pomocí PCR. Aby bylo možné rozpoznat časně známky rejekce transplantátu, měla by se provádět v pravidelných intervalech a krátce po alogenní HSCT analýza chimérismu.

Popis produktu

Sada Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit je multiplexní PCR sada určená pro sledování chimérismu. Pro rozlišení dárce a příjemce se v jedné PCR reakci současně amplifikují vysoce polymorfní krátké tandemové repetice s velmi vysokou mírou heterozygotnosti a vyváženým rozložením alel na 12 chromozomech (viz [Tabulka 1](#)). Jeden primer pro každý lokus je označen jedním z fluoroforů 6-FAM™, BTG nebo BTY. Produkty PCR se poté analyzují kapilární elektroforézou.

Tabulka 1 Informace o lokusech specifické pro Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit, * Alely, které jsou v souladu s pokyny Mezinárodní společnosti pro forenzní genetiku (ISFG) pro používání mikrosatelitových markerů

Lokus*	Genová banka Přístup	Chromozomální mapování	Ref.
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. 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

Lokus*	Genová banka Přístup	Chromozomáln í mapování	Ref.
D18S51	L18333	18q21.3	al. 1999, Lareau et al. 1996 [2, 4, 9, 10] 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]

Test byl ověřen analýzou chimérismu více než 200 párů dárce a příjemce, které se shodují v HLA, a jeho vhodnost byla potvrzena ve srovnávací klinické hodnotící studii.

Detekční limit pro kvalitativní analýzu je 125 pg genomové DNA.

Vstupní rozsah za standardních podmínek je 0,125 - 2,0 ng gDNA. Optimální vstupní dávka gDNA je 1 ng za standardních podmínek.

Při vstupu 1 ng gDNA lze dosáhnout citlivosti 1,4 % (LoD₉₅) pro analýzu informativních markerů. Pro dosažení odpovídající citlivosti se doporučuje zahrnout do analýzy co nejvíce informativních markerů, nejméně však tři. Kromě toho byly při analýze testovány také oblasti stutterů n+1, což omezilo citlivost na 4,3 %.

Dodávané materiály

Obsah sady

Tabulka 2 Obsah sady Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit

Činidlo	Barva víčka		Obsah jednoho balení		
			25 reakcí	100 reakcí	400 reakcí
Nuclease-Free Water	Světle modrá		1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Fialová		125 µL	500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® Chimera® Primer mix	Červená		63 µL	250 µL	4 x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Bílá		10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 (2 ng/µL)	Bílá		10 µL	10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Oranžová		13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® Chimera® Allelic Ladder	Zelená		25 µL	25 µL	4 x 25 µL

Přehled čísel šarží komponentů naleznete na štítku na vnitřní straně krabičky sady.

POZNÁMKA

Vezměte prosím na vědomí, že velikost balení popisuje počet testů **bez** ohledu na počet potřebných kontrol nebo přebytek potřebný pro pipetování. Pro odpovídající propustnost doporučujeme použít následující velikost:

i

- < 8 vzorků na jeden cyklus PCR: Velikost balení 25 reakcí
- 8 – 45 vzorků na jeden cyklus PCR: Velikost balení 100 reakcí
- > 45 vzorků na jeden cyklus PCR: Velikost balení 400 reakcí

Popis činidel

Nuclease-Free Water (voda bez nukleázy): Voda v kvalitě PCR, která se používá v nastavení PCR a jako kontrola bez templátu (NTC).

Reaction Mix A (Reakční mix A): PCR pufr s dNTP a MgCl₂. PCR pufr je optimalizován tak, aby podporoval aktivitu enzymů pro PCR.

Mentype® Chimera® Primer Mix (primer mix): Mix multiplexních oligonukleotidových primerů se značenými primery (značení: 6-FAM™, BTG, BTY) a neznačenými primery.

Multi Taq 2 DNA Polymerase: Hotstart Taq DNA polymeráza, 2,5 U/μL.

Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 (2 ng/μL) (kontrolní DNA): genomová DNA izolovaná z krve EDTA mužského pohlaví. DNA je heterozygotní v každém markeru sady Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit a používá se jako kvalitativní externí pozitivní kontrola.

POZNÁMKA

i

Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 je bezpečná pro laboratorní personál, protože se skládá z jednotlivých purifikovaných molekul DNA, které jsou neškodné a nemají žádné aktivní biologické funkce. Neobsahuje žádné živé buňky ani patogenní organismy, které by mohly představovat přímou hrozbu.

DNA Size Standard 550 (BTO) (standardní délka DNA): Směs fluorescenčně značených fragmentů PCR s definovanou délkou fragmentů mezi 60 a 550 bp. Tato komponenta se přidává ke každému produktu PCR před analýzou délky fragmentů a používá se k regresi velikosti pro přesné určení délky fragmentů produktů PCR.

Mentype® Chimera® Allelic Ladder (alelický žebříček): Směs produktů PCR, které představují většinu alel detekovaných testem a slouží jako genotypizační reference pro přesnou identifikaci alel.

Skladování činidel a manipulace s nimi

Sada je dodávána na suchém ledu. Komponenty sady by měly být dodány ve zmrazeném stavu, s výjimkou Multi Taq 2 DNA Polymerase. Ta je uložena v pufru, který zabraňuje zmrznutí činidla.

Po obdržení zkontrolujte, zda je sada kompletní. Nepoužívejte sady, které jsou při příjezdu rozmrazené. Pokud nejsou jedna nebo více komponent zmrazeny nebo pokud byly zkumavky nebo obal poškozeny během přepravy, nelze zaručit výkon.

Všechny součásti skladujte chráněné před světlem při teplotě - 25 °C až - 15 °C. Zejména Mentype® Chimera® Primer Mix, DNA Size Standard 550 (BTO) a Mentype® Chimera® Allelic Ladder musí být skladovány mimo dosah světla. Aby se zabránilo kontaminaci, doporučujeme skladovat a používat pre-PCR templáty (vzorky DNA, Mentype® Chimera® Control DNA XY1726) a post-PCR komponenty (DNA Size Standard 550 (BTO) a Mentype® Chimera® Allelic Ladder) odděleně od PCR činidel (Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A, Mentype® Chimera® Primer Mix).

Platnost soupravy končí podle údajů na štítku na krabici soupravy nebo 22 měsíců po otevření, podle toho, co nastane dříve. Nepřekračujte maximální počet 20 zmrazovacích a rozmrazovacích cyklů.

Potřebné, ale nedodané materiály

Všeobecné laboratorní vybavení

- Stolní odstředivka s jedním rotorem pro 2 mL a 200 µL reakční nádoby
- Odstředivka s jedním rotorem pro mikrotitrační destičky pro 96jamkové reakční destičky
- Vírový mixér
- Kalibrované, nastavitelné pipety s aerosolově těsnými jednorázovými filtračními špičkami
- Vhodné 200 µL reakční destičky s 96 jamkami nebo 200 µL reakční nádoby s vhodným těsnicím materiálem, kvalita PCR
- Vhodné stojany pro reakční nádoby o objemu 2 mL a 200 µL
- Chladicí zařízení, vhodné pro 2 mL zkumavky

- Jednorázové rukavice bez prášku
- Spektrofotometr NanoDrop™ One nebo fluorometr Qubit™

POZNÁMKA**i**

Všechny materiály použité pro PCR by měly mít odpovídající kvalitu (bez DNA a vhodné pro molekulární biologii). Ujistěte se, že všechna použitá zařízení byla nainstalována, kalibrována, zkontrolována a udržována v souladu s pokyny a doporučeními výrobce.

Činidla, sady a spotřební materiál**Tabulka 3 Potřebná, ale nedodaná činidla**

Činidlo	Poskytovatel	Objednací číslo
Matrix Standard BT5 multi (25 µL)	BIOTYPE GmbH	45-15100-0025
Matrix Standard BT5 multi (2 x 25 µL)	BIOTYPE GmbH	45-15100-0050
ChimerisMonitor IVD	BIOTYPE GmbH	46-14800-0000
QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (IVD)	Qiagen	61104
NucleoSpin® DX Blood (IVD)	Macherey-Nagel	740899.50
Hi-Di™ Formamid, 25 mL	Thermo Fisher Scientific	4311320
POP-4™ Polymer pro 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 vzorků)	Thermo Fisher Scientific	4393715
POP-7™ Polymer pro 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 vzorků)	Thermo Fisher Scientific	4393708
Anode Buffer Container (ABC) Series 3500	Thermo Fisher Scientific	4393927
Cathode Buffer Container (CBC) Series 3500	Thermo Fisher Scientific	4408256
3500 Genetic Analyzer 8 Capillary Array 36 cm	Thermo Fisher Scientific	4404683
3500 Genetic Analyzer 8 Capillary Array 50 cm	Thermo Fisher Scientific	4404685
SeqStudio™ Cartridge	Thermo Fisher Scientific	A33671 A41331
SeqStudio™ Cathode Buffer	Thermo Fisher Scientific	A33401

Přístroje a software

Sada Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit byla validována pro použití s následujícími PCR cykly:

- ProFlex PCR System (obj. č: 4484073 (blok 3 x 32 jamek), 4484075 (blok 96 jamek), Thermo Fisher Scientific)
- GeneAmp® PCR System 9700 Aluminium (ukončeno, obj. č. N805-0200; Thermo Fisher Scientific)
- Mastercycler nexus gradient (obj. č: 6331000017; Eppendorf AG)
- Biometra TOne (ukončeno, obj. č: 050-0901; Analytik Jena)
- Biometra Tadvanced (obj. č: 846-2-070-211; Analytik Jena)

K provedení testu je zapotřebí pouze jeden z výše uvedených přístrojů.

Použití jiných než výše uvedených přístrojů musí být ověřeno uživatelem. Musí být splněny následující specifikace:

- Vyhřívání víčko
- Blok vhodný pro 200 µL reakční destičky/zkumavky
- Rychlost ohřevu a chlazení nastavitelná až na 2 °C/s

Sada Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit byla validována pro použití s následujícími přístroji a nastaveními. K provedení testu je zapotřebí pouze jeden z níže uvedených analyzačních přístrojů:

- 3500 Genetic Analyzer (obj. č. 4405673; Thermo Fisher Scientific), software verze 4.0.1
 - POP-4™ polymer pro 3500/3500xL Genetic Analyzer
 - POP-7™ polymer pro 3500/3500xL Genetic Analyzer
 - 3500 Genetic Analyzer 8 Capillary Array 36 cm
 - 3500 Genetic Analyzer 8 Capillary Array 50 cm
- SeqStudio™ Genetic Analyzer (obj. č. A35644; Thermo Fisher Scientific), software verze 1.1.4

Analýza dat byla provedena pomocí následujícího ověřeného softwaru. K analýze a vyhodnocení dat je zapotřebí pouze jeden z níže uvedených softwarových balíčků. Ruční vyhodnocení souborů fsa nebo výsledků vygenerovaných pomocí Data Collection Software přístroje bez použití jedné ze dvou popsanych možností softwaru není validováno.

- ChimerisMonitor IVD (BIOTYPE GmbH)

- GeneMapper™ ID-X software, verze 1.6 (Thermo Fisher Scientific), s použitím specifického produktu:
 - Analysis Method: ChimeraVD_Analysis_v1x
 - Bin: ChimeraVD_Bins_v1x
 - Panel: ChimeraVD_Panel_v1x
 - Stutter: ChimeraVD_Stutter_v1x
 - Size Standard: BTO_60-550_v1x

POZNÁMKA



Ujistěte se, že jsou všechny použité přístroje instalovány, kalibrovány, kontrolovány a udržovány v souladu s pokyny a doporučeními výrobce.

Vzorky

Následující vzorky byly validovány pomocí sady Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit:

- Genomová DNA izolovaná z lidské periferní žilní plné krve (EDTA, citrát, heparin) pro sledování a genotypizaci.
Izolovaná gDNA se musí uchovávat neředěná při teplotě - 25 °C až - 15 °C.

POZNÁMKA



Ujistěte se, že je antikoagulant použitý k odběru krve kompatibilní s pokyny výrobce sady pro izolaci DNA.

Upozornění a bezpečnostní pokyny

- Před použitím výrobku si pečlivě přečtěte návod k použití.
- Přečtete si bezpečnostní listy (SDS) a prohlášení o nebezpečnosti (NHS) pro všechny produkty BIOTYPE. Budou vám zaslány na vyžádání nebo si je můžete stáhnout z domovské stránky (<https://www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter>). U výrobků, které neobsahují látku vzbuzující mimořádné obavy nebo podléhají jiným omezením podle nařízení 1272/2008 (CLP), a proto nevyžadují SDS, poskytnete BIOTYPE SDS na vyžádání.

- Pro získání kopií bezpečnostních listů pro případná další potřebná činidla se obraťte na příslušné výrobce.
- Součásti sady z různých šarží se nesmí míchat.
- Alikvotování složek sady do jiných reakčních nádob není povoleno.
- Tento produkt mohou používat pouze profesionální laboratorní uživatelé vyškolení v molekulárně genetických technikách, multiplexní PCR a v používání genových analyzátorů Thermo Fisher Scientific.
- Před prvním použitím zkontrolujte výrobek a jeho součásti na:
 - Neporušenost
 - Úplnost z hlediska počtu, typu a náplně (viz kapitola Dodávané materiály)
 - Správné označení
 - Stav při dodání (všechny komponenty zmrazené, kromě Multi Taq 2 DNA Polymerase)
- Se vzorky by se mělo vždy zacházet jako s infekčními a/nebo biologicky nebezpečnými a v souladu s bezpečnými laboratorními postupy a správnou laboratorní praxí.
- Nepoužívejte sadu, jejíž datum použitelnosti již vypršelo.
- Vzorky a odpad ze sady zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.
- Všechny použité přístroje musí být instalovány, kalibrovány, kontrolovány a udržovány v souladu s pokyny a doporučeními výrobce.

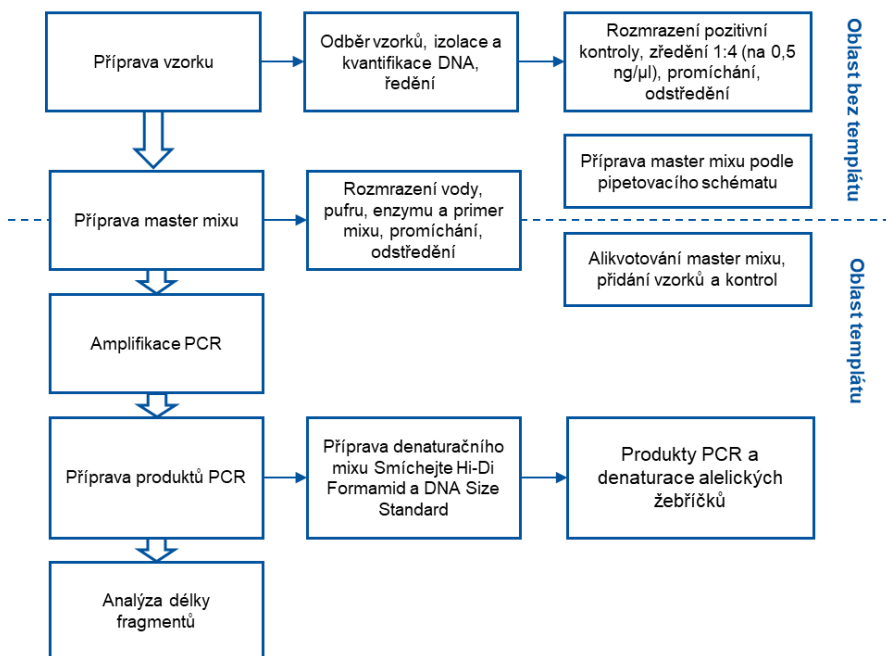
Poznámka pro uživatele

Jakýkoli problém, který se vyskytne v souvislosti s výrobkem, musí uživatel nahlásit výrobci. Všechny závažné události týkající se této sady musí být nahlášeny výrobci a příslušnému orgánu členského státu, ve kterém má uživatel a/nebo pacient sídlo.

Souhrn údajů o bezpečnosti a funkční způsobilosti (SSP) je vytvořen v souladu s článkem 29 nařízení (EU) 2017/746 a jeho účelem je poskytnout určeným uživatelům, v případě tohoto prostředku pouze laboratorním odborníkům, veřejný přístup k aktualizovanému souhrnu údajů o bezpečnosti a funkční způsobilosti prostředku prostřednictvím databáze EUDAMED.

Postup

Přehled experimentálního pracovního postupu



Příprava vzorku

Požadavky na výchozí materiál

Odeberte nejméně 200 μL periferní žilní plné krve pro následující postup.

Manipulace s výchozím materiálem (periferní žilní plná krev) by se měla řídit doporučeními pokynu MM05-A2 (2. vydání) *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI): Plnou krev lze skladovat při pokojové teplotě (22 °C až 25 °C) po dobu až 24 hodin nebo při teplotě 2 °C až 6 °C po dobu 72 hodin nebo déle. Při odběru plné krve se rovněž doporučuje použít jako antikoagulant EDTA, citrát nebo heparin.

POZNÁMKA

Dlouhé skladování výchozího materiálu může vést k fragmentaci genetického materiálu, a tím k nedostatečné kvalitě. To může zhoršit výsledek analýzy, např. kvůli neúplným profilům.

Extrakce DNA

Proveďte extrakci a purifikaci DNA ze vzorků periferní žilní plné krve podle pokynů výrobce. V rámci hodnocení výkonu výrobku byly přezkoumány následující sady:

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit
- Macherey-Nagel NucleoSpin® Dx Blood, minisada pro DNA z krve s certifikací CE

POZNÁMKA

Kontaminaci krve lze v reakci PCR nebo v izolované DNA zjistit podle oranžového zbarvení. Pokud je pozorována změna barvy, doporučujeme izolaci DNA opakovat, aby se zabránilo možné interferenci.

POZNÁMKA

Před elucí nukleové kyseliny se ujistěte, že jsou odstraněny všechny stopy etanolu. Etanol je silným inhibitorem PCR.

Kvantifikace a ředění DNA

Stanovte koncentraci DNA pomocí UV/VIS spektroskopie při 260 nm spektrofotometrem NanoDrop nebo pomocí fluorescenční spektroskopie fluorometrem Qubit™.

Pro spektrofotometrii použijte k měření slepého vzorku eluční pufr ze sady pro extrakci DNA. Poměr A_{260}/A_{280} by měl být v rozmezí 1,7 - 1,9, zatímco poměr A_{260}/A_{230} by měl být v rozmezí 1,8 - 2,3 nebo podle doporučení výrobce sady pro extrakci DNA.

Pro fluorometrickou kvantifikaci DNA lze fluorometr Qubit™ použít buď se sadou Qubit 1x dsDNA HS Assay-Kit nebo Qubit dsDNA BR Kit.

Pro použití se sadou Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit nařed'te vzorky DNA na optimální koncentraci 1,0 ng/μL. Před použitím připravte čerstvé naředění. Jako ředidlo použijte vodu bez nukleázy.

POZNÁMKA



Vstupní rozsah pro sadu je 0,125 - 2,0 ng DNA na reakci, **optimální vstup je 1 ng DNA** na reakci za standardních podmínek pro dosažení nejvyšší citlivosti. Vstup nižší než 0,125 ng může vést k neúplným profilům, vyšší vstup může vést k pull-up píkům.

Skladování DNA

DNA by měla být skladována neředěná při - 25 °C až - 15 °C pro dlouhodobé skladování nebo podle pokynů výrobce sady pro izolaci DNA.

Příprava kontrolních vzorků

Pozitivní kontrola PC

Rozmrazte Mentype® Chimera® Control DNA XY1726, homogenizujte ji promícháním a následně krátce odstřed'te.

Zřed'te Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 1:4 z 2,0 ng/μL na 0,5 ng/μL s Nuclease-Free Water.

Zředěnou PC homogenizujte krátkým promícháním a poté krátkým odstředěním (přibližně 10 s). Zředěnou pozitivní kontrolu neskladujte.

POZNÁMKA



Vždy používejte čerstvé ředění Mentype® Chimera® Control DNA XY1726.

Kontrola bez templátu NTC

Místo vzorku použijte Nuclease-Free Water obsaženou v sadě jako kontrolu bez templátu (NTC).

Příprava master mixu

Ze sady Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit vyjměte následující komponenty pro nastavení master mixu:

- Nuclease-Free Water (světle modré víčko)
- Reaction Mix A (fialové víčko)
- Mentype® Chimera® Primer Mix (červené víčko)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (bílé víčko)

Všechny zmrazené složky se rozmrazí při pokojové teplotě (22 °C až 25 °C, přibližně 30 minut, chráněné před světlem) a homogenizují se jemným promícháním. Poté se činidla krátce odstředí (přibližně 10 s). V souladu se zásadami správné laboratorní praxe se doporučuje uchovávat Multi Taq 2 DNA Polymerase v chlazeném prostředí (např. na chladicím zařízení) co nejdéle před přípravou master mixu.

POZNÁMKA



Multi Taq 2 DNA Polymerase míchejte otáčením abyste dosáhli delší stability – **enzym nemíchejte**.

Připravte PCR master mix podle Tabulka 4 do mikrocentrifugační zkušavky vhodné velikosti pro celkový počet testovaných vzorků v čistém prostoru, který je k tomu určen. Do výpočtu zahrňte alespoň jeden PC a jeden NTC.

POZNÁMKA



Jako orientační hodnota platí: Pokud testujete méně než 10 vzorků, použijte dostatečné množství master mixu pro další vzorek. Pokud testujete 10 nebo více vzorků, použijte objem master mixu +10 %.

Tabulka 4 Příprava PCR master mixu, * Objem závisí na koncentraci DNA. Pokud se použije větší objem templátu DNA, je třeba upravit objem Nuclease-Free Water. Celkový objem činidla na reakci (Rkt.) musí být vždy 25,0 µL.

Komponenta	Objem na počet reakcí		
	1 reakce	5 reakcí	10 reakcí
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
Templát DNA nebo kontrolní vzorek	1,0 µL*	5 x 1,0 µL*	10 x 1,0 µL*
Celkový objem	25,0 µL	125,0 µL	250,0 µL

Master mix jemně promíchejte a poté směs krátce odstředíte.

Alikvotujte 24,0 µL PCR master mixu do připravených 200 µL PCR zkumavek a uzavřené zkumavky krátce odstředíte.

Použití DNA templátů a kontrol

Do připravených zkumavek obsahujících PCR master mix přidejte 1,0 µL následujících typů vzorků.

NTC: Přidejte místo vzorku 1,0 µL Nuclease-Free Water.

Vzorek: přidejte 1,0 µL připravených naředěných vzorků gDNA (1,0 ng/µL).

PC: místo vzorku přidejte 1,0 µL připravené Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 naředěné v poměru 1:4 (0,5 ng/µL).

POZNÁMKA



Nejprve připravte NTC, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku. PC připravte jako poslední, aby nedošlo ke křížové kontaminaci vzorků.

POZNÁMKA

Použijte alespoň jednu pozitivní kontrolu (PC) a jednu kontrolu bez templátu (NTC) na jeden cyklus. V opačném případě nelze postup potvrdit.

Uzavřete všechny nádoby PCR, opatrně je promíchejte a odstředíte.

Amplifikace PCR

Naprogramujte PCR cyklér podle následujícího protokolu a nastavte rychlost ohřevu a chlazení (ramping) na 2 °C/s. Proveďte "Hot Start" PCR, abyste aktivovali polymerázu a zabránili vzniku nespecifických amplifikačních produktů.

Tabulka 5 Protokol PCR

Teplota	Čas	
94 °C	4 min	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	30 cyklů
72 °C	75 s	
68 °C	60 minut	
10 °C	∞	podržet

POZNÁMKA

Pokud se používají termální cykly s rychlým ohřevem a chlazením (> 2 °C/s), je třeba pro zajištění optimální rovnováhy signálu **nastavit ramping na 2 °C/s**.

POZNÁMKA

Základní informace o nastavení, programování a údržbě různých zařízení PCR naleznete v uživatelské příručce k příslušnému zařízení.

POZNÁMKA

Velmi malé množství DNA může vést ke statistickým chybám a nevyváženosti píků. S rostoucím počtem cyklů PCR roste i riziko křížové kontaminace v důsledku minimálního množství nečistot. Kromě toho se mohou vyskytnout nespecifické amplifikační produkty.

Kapilární gelová elektroforéza

Příprava produktů PCR

Po dokončení PCR vyjměte vzorky z cykleru a krátce je odstředte.

POZNÁMKA

Po dokončení PCR lze produkty PCR skladovat až 4 týdny při teplotě 2 °C až 8 °C nebo dlouhodobě při teplotě - 25 °C až - 15 °C chráněné před světlem.

Rozmrázte následující činidla, poté je jemně promíchejte a odstředte:

- Hi-Di™ Formamid (není součástí sady)
- Mentype® Chimera® Allelic Ladder (zelené víčko)
- DNA Size Standard 550 (BTO) (oranžové víčko)

Připravte denaturační směs podle Tabulka 6 a přidejte jednu nebo dvě reakce, abyste vyrovnali odchylky při pipetování. Přidejte další reakci pro alelický žebříček.

Tabulka 6 Denaturační směs

Komponenta	Objem na reakci
Hi-Di™ Formamid	12,0 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µL

Napipetujte 12,0 µL denaturační směsi do jamek PCR destičky (vhodné pro použití v genetickém analyzátoru).

Do jamek přidejte buď 1,0 µL produktu PCR, nebo 1,0 µL Mentype® Chimera® Allelic Ladder. Uzavřete PCR destičku vhodnou fólií, krátce ji promíchejte a odstředíte.

POZNÁMKA



Alelický žebříček slouží ke správnému určení analyzovaných fragmentů během analýzy dat. V každé analýze délky fragmentů musí být alelický žebříček analyzován alespoň jednou, aby bylo zajištěno úspěšné vyhodnocení dat.

POZNÁMKA



Kapiláry přístroje pro gelovou elektroforézu nesmí nikdy vyschnout. Pokud vzorky neobsadí všechny pozice kapilár, naplňte další jamky destičky 12,0 µL Hi-Di™ Formamid podle počtu kapilár.

Připravené produkty PCR denaturujte na PCR cykléru po dobu 3 minut při 95 °C a poté vzorky v cykléru ochlaďte na 4 °C. Před analýzou délky fragmentů vzorky krátce odstředíte.

Analýza délky fragmentu

Před první analýzou délky fragmentu se provede pomocí Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE GmbH) spektrální porovnání fluorescenčních barviv použitých pro sadu Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit (6-FAM™, BTG, BTY, BTO).

POZNÁMKA



Při instalaci Matrix Standard BT5 multi je nutné dodržovat návod k použití. Ten najdete na www.biotype.de/en/ifus nebo ho obdržíte na vyžádání na adrese support@biotype.de u BIOTYPE GmbH.

Po úspěšném provedení Matrix Standard BT5 multi importujte dodaná nastavení přístroje pro 3500 Series Genetic Analyzer dle popisu v Tabulka 7. (www.biotype.de/en/template-files).

Informace o nastavení Run Modulen pro SeqStudio™ Genetic Analyzer najdete v Tabulka 8.

Tabulka 7 poskytnuté soubory pro 3500 Series Genetic Analyzer
(www.biotype.de/en/template-files)

3500 Series Genetic Analyzer	
Instrument Protocol	<u>POP-4™, 36 cm kapilární soustava:</u> ChimeraIVD_Instrument436.xml
	<u>POP-7™ 50 cm kapilární soustava:</u> ChimeraIVD_Instrument750.xml
Size Standard Protocol	BTO_60-550_SizeStandard.xml
Sizecalling Protocol	BTO_60-550_Sizecalling.xml
Assay	<u>POP-4™, 36 cm kapilární soustava:</u> ChimeraIVD_Assay436.xml
	<u>POP-7™ 50 cm kapilární soustava:</u> ChimeraIVD_Assay750.xml

Specifikace požadovaného protokolu přístroje jsou popsány v Tabulka 8. Upravte pouze popsané parametry, ostatní parametry by měly zůstat ve výchozím nastavení. Při nastavování konkrétních provozních parametrů postupujte podle návodu k použití od výrobce.

Tabulka 8 Parametry modulů různých přístrojů pro kapilární gelovou elektroforézu

	Injection Voltage [kV]	Injection Time [s]	Run Voltage [kV]	Run Time [s]
3500 Series Genetic Analyzers	3.0	8	36 cm kapilární soustava: 15	1560
			50c m kapilární soustava: 19.5	
SeqStudio™ Genetic Analyzer	1.2	10	9	1560

Odchylně od hodnot v Tabulka 8 lze dobu chodu upravit v závislosti na délce použité kapilární soustavy, ale je nutné analyzovat všechny fragmenty (60 - 550 bp) DNA Size Standard 550 (BTO).

Chcete-li nastavit protokol standardu veličin, je třeba přiřadit oranžovému panelu následující veličiny pro DNA Size Standard 550 (BTO):

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

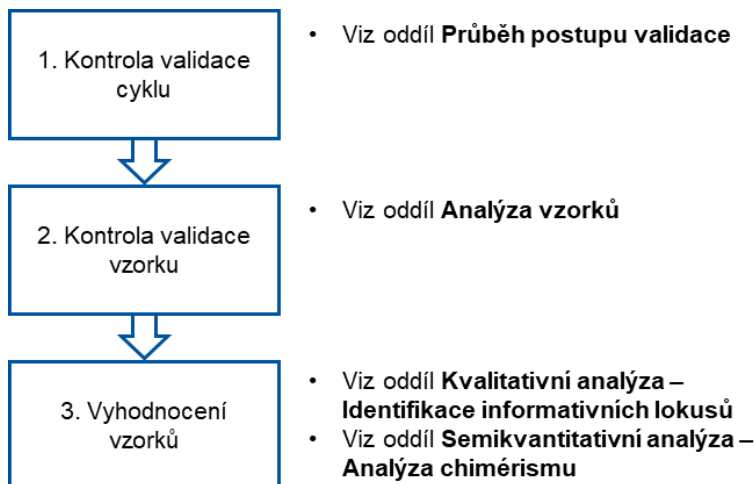
POZNÁMKA



Společnost BIOTYPE GmbH poskytuje specifické šablony pro snadnou instalaci specifických nastavení procesu pro analýzu délky fragmentů a také analytické šablony pro snadné nastavení softwaru GeneMapper™ ID-X. Tyto předlohy jsou k dispozici ke stažení na adrese: www.biotype.de/en/template-files

Analýza dat

Obecný postup analýzy dat



POZNÁMKA

Analýza dat musí být provedena pomocí softwaru ChimerisMonitor IVD nebo softwaru GeneMapper™ ID-X (Thermo Fisher Scientific). Ruční vyhodnocení souborů fsa nebo výsledků vygenerovaných pomocí Data Collection Software přístroje bez použití jedné ze dvou popsaných možností softwaru není validováno.

Průběh postupu validace

1. Platný alelický žebříček

- Validní DNA Size Standard 550 (BTO)
Cut-off: ≥ 50 RFU
- Validní výška píku
Cut-off: ≥ 200 RFU
- Všechny očekávané píky jsou přítomny
(viz příloha obrázek 6)

2. Validní pozitivní kontrola PC

- Validní DNA Size Standard 550 (BTO)
Cut-off: ≥ 50 RFU
- Validní výška píku
Cut-off: ≥ 200 RFU
- Všechny očekávané píky jsou přítomny
(viz příloha obrázek 7)

3. Valide No Template kontrola NTC

- Validní DNA Size Standard 550 (BTO)
Cut-off: ≥ 50 RFU
- Nad Cut-off nebyly zjištěny žádné píky ≥ 200 RFU
(viz příloha obrázek 8)

POZNÁMKA

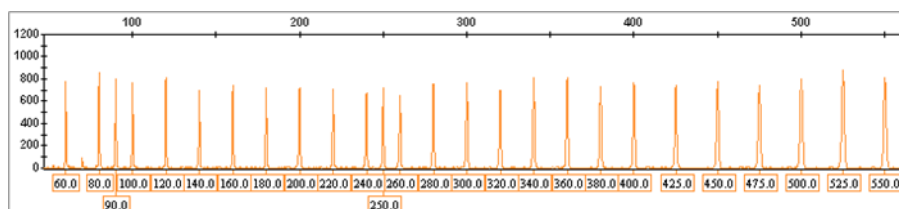
Pro posouzení platnosti je třeba analyzovat rozsah měření 50 - 560 bp.

DNA Size Standard 550 (BTO)

Stanovení přesné délky amplifikovaných produktů závisí na typu přístroje, podmínkách elektroforézy a použitém standardu velikosti DNA. Vzhledem ke složitosti některých STR lokusů by mělo být určení velikosti založeno na rovnoměrně rozložených referencích.

U všech vzorků zkontrolujte DNA Size Standard 550 (BTO) podle následujících kritérií:

- Přítomnost všech fragmentů: **60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 a 550 bp**
- Všechny fragmenty jsou k dispozici s výškou píku nad mezní hodnotou ≥ 50 RFU.
- Koeficient determinace $R^2 > 0,995$.
- Výška píku fragmentů se s rostoucí délkou fragmentu plynule nesnižuje.



Obrázek 1 Elektroferogram DNA Size Standard 550 (BTO), fragmenty s délkami v bp

Mentype® Chimera® Allelic Ladder

Po zajištění platného velikostního standardu zkontrolujte, zda jsou v alelickém žebříčku přítomny všechny dostupné píky s výškou píku nad mezní hodnotou ≥ 200 RFU.

POZNÁMKA

i

Mentype® Chimera® Allelic Ladder obsahuje fragmenty pro většinu alel, ale ne pro všechny. Porovnejte alely s dodatke [Tabulka 22](#) - [Tabulka 25](#) a [Obrázek 5](#).

Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 (PC)

Poté, co zajistíte platný standard velikosti, se ujistěte, že je k dispozici kompletní profil DNA všech specifických píků pro PC s výškou píku nad **mezní hodnotou ≥ 200 RFU** (viz Tabulka 9). Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 je kvalitativní kontrola PCR, která zajišťuje výkonnost master mixu obecně.

Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 (vizdodatek Obrázek 6) jako součást testovací sady představuje následující alely:

Tabulka 9 Genotyp Mentype® Chimera® Control DNA XY1726

Mentype® Chimera® Control DNA XY1726		Mentype® Chimera® Control DNA XY1726	
Lokus		Lokus	
Modrý panel		Zelený panel	
Amelogenin	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	Žlutý panel	
D6S474	14 / 15	D10S2325	9 / 11
D4S2366	9 / 11	SE33	26.2 / 28.2

No Template Control NTC

Poté, co se ujistíte, že byl použit platný standard velikosti, zkontrolujte, zda v rozsahu binů NTC jsou detekovány žádné píky nad mezní hodnotou ≥ 200 RFU (viz dodatek Obrázek 6).

POZNÁMKA

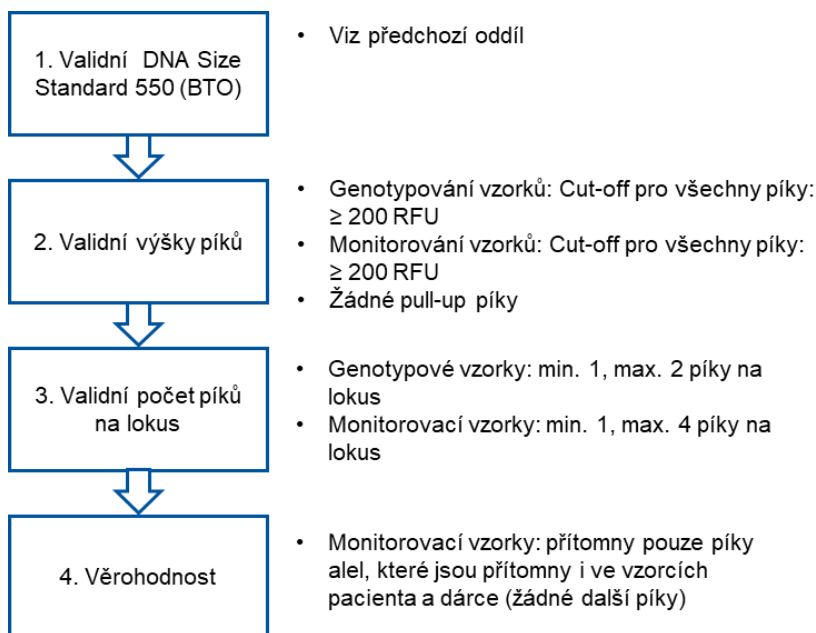
Pokud pro metodu analýzy použijete ChimerisMonitor IVD nebo GeneMapper™ ID-X spolu s dodanými soubory šablon, píky 200 RFU nejsou automaticky označeny názvem alely, což vám usnadní vyhodnocení výsledků.

POZNÁMKA

V NTC se mohou častěji vyskytovat artefakty, jako jsou malé barevné skvrny. Vzhledem k široké základně píku, abnormálnímu tvaru píku a absenci přiřazení píku je možné rozlišit píky amplikonů.

Analýza vzorků

Proces analýzy dat



Software ChimerisMonitor IVD automaticky provede popsané validační kroky pro proces a vzorky.

Pomocí softwaru GeneMapper™ ID-X a specifických templátů od společnosti BIOTYPE GmbH se základní validace provádí automaticky.

Kvalitativní analýza – identifikace informativních lokusů

V následující části je vysvětlena identifikace a rozlišení lokusů specifických pro příjemce. Lokusy specifické pro dárce jsou proto definovány jako neinformativní. Identifikace informativních lokusů je založena na údajích od příjemce a dárce před transplantací. Pro příklady viz Tabulka 25 v dodatku.

Software ChimerisMonitor IVD podporuje identifikaci informativních lokusů.

Informativní lokusy: Alespoň jednu alelu ve vzorku příjemce nelze zjistit ve vzorku dárce. Tato alela se nesmí nacházet v oblasti stutteru dárcovského vzorku.

Stutter (n+1) lokusy: Pík specifický pro příjemce se překrývá s n+1 stutterem píku specifického pro dárce. Takové lokusy lze použít, pokud je k dispozici pouze několik informativních lokusů a očekávaná hodnota chimérismu příjemce je vyšší než 5 %.

Stutter (n-1) lokusy: Pík specifický pro příjemce se překrývá s n-1 stutterem píku specifického pro dárce. Takové lokusy by se měly používat pouze tehdy, pokud nejsou k dispozici žádné jiné informativní lokusy nebo (n+1) stutter lokusy.

POZNÁMKA



Při použití stutter lokusů (n-1) pro semikvantitativní analýzu je citlivost snížena v důsledku překrývání alely specifické pro příjemce a stutteru alely dárce.

Neinformativní lokusy: Lokusy, kde se pík(y) specifický(é) pro příjemce překrývá(jí) s píkem(y) specifickým(i) pro dárce, nebo lokusy specifickými pro dárce.

Semikvantitativní analýza – analýza chimérismu

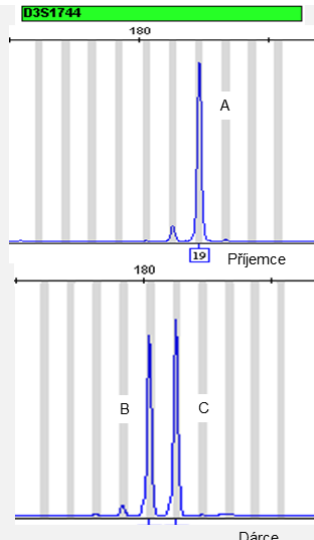
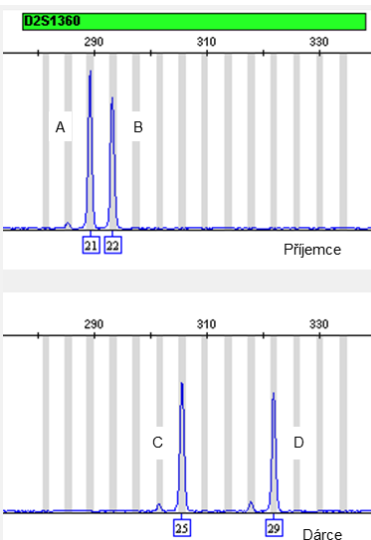
Semikvantitativní analýza chimérismu se provádí podle popisu v literatuře, např. podle Clark et al. (2015) [15] nebo Nollet et al. (2001) [16]. Vzorce pro kvantifikaci závisí na konstelaci alel v lokusu a jsou uvedeny níže v Tabulka 10 a Tabulka 11 (převzato z Clark et al. [15]). Hodnota chimérismu se vypočítá pro každý předtím vybraný informativní lokus. Poté se vypočítá průměrná hodnota všech hodnot chimérismu specifických pro daný lokus. Aby bylo dosaženo co nejvyšší citlivosti, měly by být do výpočtu chimérismu zahrnuty alespoň tři informativní markery. Doporučuje se použít informativní markery specifické pro pacienta pro všechny oblasti chimérismu (mixed chimerism, MC) nebo případně použít další oblasti s n+1 markery specifickými pro pacienta pro oblasti se středním až vysokým smíšeným chimérismem (> 5 %).

POZNÁMKA

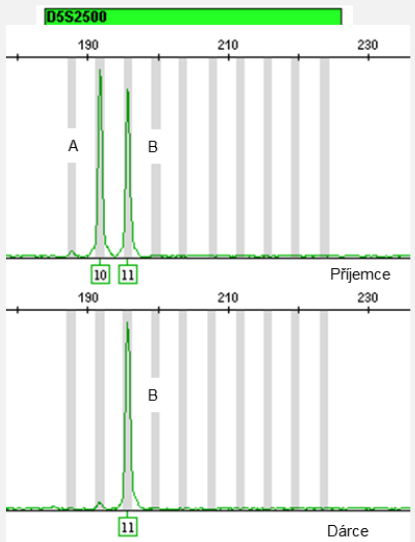
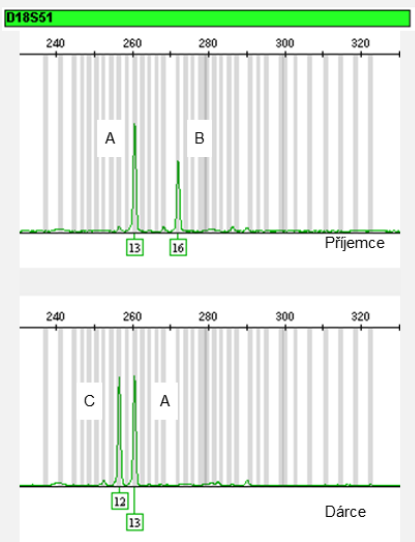


K vyhodnocení standardní odchylky jednotlivých markerů (SD_{Marker}) se doporučuje analyzovat odlehle hodnoty jednotlivých markerů. SD_{Marker} u vzorků s nízkým smíšeným chimérismem (< 5 % MC) by neměla překročit 4 %. U vzorků se středním až vysokým smíšeným chimérismem (> 5 % MC) by SD_{Marker} neměl překročit 10 %. Pokud SD_{Marker} překročí tyto limity, doporučuje se znovu analyzovat hodnoty MC vybraných markerů bez odlehých hodnot.

Tabulka 10 Semikvantitativní analýza chimérismu (podle Clarka et al. [15]) – scénář 1 a 2

Scénář 1	Scénář 2
Žádné společné alely: Příjemce je homozygot, dárce je heterozygot, nejsou sdíleny žádné píky  Podíl příjemce: $\% \text{ Chimérismus} = \frac{A}{A+B+C} \times 100\%$	Žádné společné alely: Příjemce i dárce jsou heterozygoti, nejsou sdíleny žádné píky  Podíl příjemce: $\% \text{ Chimérismus} = \frac{A+B}{A+B+C+D} \times 100\%$

Tabulka 11 Semikvantitativní analýza chimérismu (podle Clarka et al. [15]) – scénář 3 a 4

Scénář 3	Scénář 4
Jedna společná alela (homozygotní): Příjemce je heterozygot, dárce je homozygot, je sdílen jeden pík 	Jedna společná alela (heterozygotní): Příjemce i dárce jsou heterozygoti, je sdílen jeden pík 
Podíl příjemce: $\% \text{Chimérismus} = \frac{A}{\left(\frac{B-A}{2}\right) + A} \times 100\%$	Podíl příjemce: $\% \text{Chimérismus} = \frac{B}{B + C} \times 100\%$

Analýza dat pomocí ChimerisMonitor IVD

ChimerisMonitor IVD je intuitivní software pro automatickou analýzu dat, vyhodnocení procesu a výpočet chimérismu. Integrovaný systém pro správu pacientů umožňuje sledování kinetiky chimérismu ve zprávách s vysokým rozlišením, ale také v diagramech a tabulkové vizualizaci. Obecné pokyny pro analýzu vzorků naleznete v návodu k použití softwaru ChimerisMonitor IVD. Všechny požadované šablony analýz jsou součástí správy testovací sady ChimerisMonitor IVD. Ty obsahují jak metody analýzy, tak propojené šablony Bin a Panel. Během importu procesu provádí software obecné integrované vyhodnocení podle podle oddílu. Viz Tabulka 12 pro obecný popis procesu analýzy dat pomocí ChimerisMonitor IVD.

POZNÁMKA

i

Analýza dat musí být provedena pomocí softwaru ChimerisMonitor IVD nebo softwaru GeneMapper™ ID-X (Thermo Fisher Scientific). Ruční vyhodnocení souborů fsanebo výsledků vygenerovaných pomocí Data Collection Software přístroje bez použití jedné ze dvou popsanych možností softwaru není validováno.

Tabulka 12 Pracovní postup analýzy chimérismu pomocí ChimerisMonitor IVD

Č.	Ikona	Pracovní krok
1		Import vzorků
		Create new patient. V administraci pacientů se zobrazí databáze všech vytvořených pacientů. Batch Import: - Vyberte testovací sadu Biotype Mentype Chimera. Všechny mezní hodnoty pro správné provedení a vyhodnocení vzorku jsou spojeny s příslušnou metodou analýzy.
		- Importujte proces obsahující soubory fsa alelického žebříčku, pozitivní kontrolu, kontrolu bez templátu a vzorky. - Vyberte ručně typy vzorků (důležité pro správné přiřazení píků a výpočet chimérismu) - Obecné vyhodnocení procesu a vzorků provádí software

Č.	Ikona	Pracovní krok
		Otevřete Batch Import Management .
		Assign Sample: Vyberte vzorek a přiřadte jej k pacientovi.
2		Kontrolní kontroly – ChimerisMonitor IVD provádí integrované hodnocení kvality i hodnocení procesu a vzorků. Zkontrolujte alelický žebříček Allelic Ladder Electropherogram a Size Calling-Regression . Zobrazí se případná upozornění na kvalitu: - Evaluation of Allelic Ladders během importu procesu na registrační kartě - Na registrační kartě FSA Import Warnings v editoru pacienta
		Kontrola Positive Control Electropherogram a Size Calling Regression
		Evaluation of Positive and No Template Controls během importu procesu zobrazuje možná varování o kvalitě.
		Zkontrolujte No Template Control Electropherogram a Size Calling Regression . Evaluation of Positive and No Template Controls během importu procesu zobrazuje možná varování o kvalitě.
3		Vyhodnocení vzorků
		Zkontrolujte vzorek Sample Electropherogram Správné přiřazení píků je nezbytné pro přesnou definici informativních markerů a solidní výpočet chimérismu. Sample Quality vzorků během importu procesu indikuje případná varování týkající se kvality.
		Kontrola standardní regrese velikosti vzorku. Sample Quality vzorku během importu dávky indikuje případná varování týkající se kvality.
4		Definice informativních markerů
		Create a new transplantation: Pro sledování pacienta lze zvolit předdefinované markery.
5		Analýza chimérismu
		Calculate Chimerism: Zobrazí se předvolené markery pro analýzu chimérismu a vypočítá se chimérismus (chimérismus jednotlivých markerů, celkový chimérismus a standardní odchylka).
6		Zpráva
		Create Report:

Č.	Ikona	Pracovní krok
Jednotlivé hodnoty a kinetika chimérismu se zobrazují v čase (tabulka a graf, formát souboru pdf nebo csv).		
7		Vývoj databázově podporovaného systému pro pacienty Patient Management .

Analýza dat pomocí GeneMapper™ ID-X

Příprava GeneMapper™ ID-X Software

Obecné pokyny pro použití a analýzu vzorků s tímto softwarem naleznete v uživatelské příručce k softwaru GeneMapper™ ID-X.

Přiřazení alel se provede pomocí analytického softwaru GeneMapper™ ID-X v kombinaci s Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit šablonou BIOTYPE GmbH. Šablony BIOTYPE (viz Tabulka 13) jsou k dispozici ke stažení na naší domovské stránce (www.biotype.de/en/template-files) nebo je na vyžádání na support@biotype.de zašleme. Pracovní postup analýzy chimérismu pomocí softwaru je popsán GeneMapper™ ID-X v Tabulka 14.

Tabulka 13 BIOTYPE GmbH Šablony pro software GeneMapper™ ID-X

Šablona	Název šablony	
Panels*	ChimeraIVD_Panel_v1x	nebo vyšší
Bin Sets*	ChimeraIVD_Bins_v1x	nebo vyšší
Size Standard*	BTO_60-550_v1x	nebo vyšší
Analysis Method*	ChimeraIVD_Analysis_v1x	nebo vyšší
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 Alleles	
	Table for 10 Alleles	
Stutter [#]	ChimeraIVD_Stutter_v1x	nebo vyšší

*Tyto šablony je třeba vždy použít pro analýzu dat. Ostatní soubory šablon jsou volitelné.

[#] Při načítání výše uvedených panelů se nastavení stutterů nepoužije. Data stutterů je proto nutné importovat samostatně.

POZNÁMKA

i

Import a přiřazení alel pomocí poskytnutých souborů šablon je zaručeno pouze v případě použití softwaru GeneMapper™ ID-X. Při použití softwaru GeneMapper™ se mohou u některých souborů šablon vyskytnout problémy s importem. Možná bude nutné přizpůsobit Panels a Bins konkrétnímu výkonu přístroje pomocí jednoho nebo více procesů alelického žebříčku. Kontaktujte nás pro podporu (support@biotype.de).

Tabulka 14 Pracovní postup analýzy chimérismu pomocí GeneMapper™ ID-X

Č.	Ikona	Pracovní krok						
1		Příprava softwaru						
		Panel Manager Importujte dodané soubory templátupro Panel, Bins, Stutter.						
		GeneMapper™ ID-X Manager Importujte dodané soubory šablony pro metodu analýzy a standard velikosti.						
2		Import vzorků						
		Add Samples to Project (Přidat vzorky do projektu) - Projděte složku spuštění, vyberte ji a Add to List → Add .						
3		Analýza vzorků						
		V příslušných sloupcích vzorkového listu vyberte následující vlastnosti a zvolte možnost Analyze .						
		<table><tr><th>Název sloupce</th><th>Vyberte</th></tr><tr><td>Sample Type</td><td>Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control nebo Sample</td></tr><tr><td>Analysis Method</td><td>Vyberte dříve importované BIOTYPE GmbH Template ChimeraIVD_Analysis_v1x</td></tr></table>	Název sloupce	Vyberte	Sample Type	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control nebo Sample	Analysis Method	Vyberte dříve importované BIOTYPE GmbH Template ChimeraIVD_Analysis_v1x
Název sloupce	Vyberte							
Sample Type	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control nebo Sample							
Analysis Method	Vyberte dříve importované BIOTYPE GmbH Template ChimeraIVD_Analysis_v1x							

Č.	Ikona	Pracovní krok
		Panel Vyberte dříve importované BIOTYPE GmbH Template ChimeraIVD_Panel_v1x Size Standard Vyberte dříve importované BIOTYPE GmbH Template BTO_60-550_v1x
4	Kontrola kontrol	
		Kontrola validnosti kontrol (alelický žebříček, pozitivní kontrola, kontrola bez šablony).
		Pokud jsou výšky píků dostatečné, provede se přiřazení podle specifikací v metodě analýzy.
5	Vyhodnocení vzorků	
		Zkontrolujte validnost vzorku.
		Pokud jsou výšky píků dostatečné, provede se přiřazení podle specifikací v metodě analýzy.
		Pokud nejsou píky přiřazeny, přestože je dosaženo dostatečné výšky, je možné je přiřadit ručně. Zkontrolujte prosím věrohodnost všech přiřazených píků.
6	Definice informativních markerů	
		Porovnejte genotypy příjemce a dárce a poté ručně identifikujte informativní markery. Viz dodatek <u>Příklady kvalitativního hodnocení lokusů</u>
7	Analýza chimérismu	
		Exportujte Sizing Table a vypočítejte hodnoty chimérismu podle <u>Tabulka 10</u> a <u>Tabulka 11</u> – viz oddíl <u>Semikvantitativní analýza – analýza chimérismu</u>

POZNÁMKA

Pomocí dodaných souborů šablon pro metodu analýzy, binů a panelů a výběrem vhodného typu vzorku je platnost těchto vzorků automaticky kontrolována softwarem. Značky kontroly kvality SOS (Sample off-Scale), SQ (Sizing Quality), OMR (Outside Marker Range) musí být zvýrazněny zeleně, pokud je platnost splněna.

ARNM	SOS	SQ	SSPK	MIX	OMR	CGQ

POZNÁMKA

K vyhodnocení standardu velikosti použijte Size Match Editor v GeneMapper™ ID-X. Pokud automatické přiřazení fragmentů selže, lze jako vodítko pro ruční přiřazení píků použít triplety 80 / 90 / 100 bp a 240 / 250 / 260 bp.

Řešení problémů

Post-PCR analýza a automatické přiřazení alel pomocí vhodného analytického softwaru zajišťují přesné a spolehlivé rozlišení alel. Automatický výpočet poměru mezi DNA dárce a příjemce, stejně jako standardní odchylky a detekční limity lze získat přímo ze surových dat analýzy velikosti fragmentů. Pokud mají být výsledky získané pomocí Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit porovnány s výsledky cytologických analýz, je třeba zajistit, aby byly cytologické analýzy provedeny s nejméně 200 leukocyty.

Pull-up píky

Pull-up píky se mohou objevit, pokud jsou výšky píků mimo lineární detekční rozsah nebo pokud byla použita nesprávná matrice. Mohou se objevit na pozicích určitých píků v jiných barevných panelech, obvykle s nižší intenzitou signálu. Pokud to pozorujete pravidelně, měli byste zvážit opakování generování matrice a zkontrolovat, zda není vstup DNA nadměrný.

Stutter píky

Výskyt stutter píků závisí na sekvenci struktury repetice a počtu alel. Píky N-4 vznikají v důsledku ztráty opakovací jednotky během amplifikace tetranukleotidových STR motivů způsobené skluzovým efektem Multi Taq 2 DNA Polymerase. Tyto píky by měly být interpretovány v souladu se soubory šablon softwaru GeneMapper™ ID-X. ChimerisMonitor IVD rozpozná stutter píky a automaticky upraví počet informativních lokusů.

Artefakty

Teplota v místnosti může ovlivnit chování produktů PCR na vícekapilárních přístrojích a může dojít ke vzniku ramenních píků nebo splittových píků. V některých případech lze ovlivnit i automatické přiřazení. Pokud se tyto účinky objeví, doporučujeme vzorek znovu vstříknout při vyšší pokojové teplotě a případně použít více než jeden vzorek alelického žebříčku na jeden proces. Kromě toho se ve vzorcích a ještě zřetelněji v NTC mohou vyskytovat artefakty, jako jsou barevné skvrny. Vzhledem k široké základně píku, abnormálnímu tvaru píku a absenci přiřazení píku je možné rozlišit skutečné amplifikáty.

Přidávání nukleotidů nezávisle na šabloně

Díky své terminální transferázové aktivitě má Multi Taq 2 DNA Polymerase tendenci přidávat adenosinový radikál na 3konec amplifikovaných fragmentů DNA. Artefaktní pík je o jednu bázi kratší, než se očekávalo (pík -1 bp). Všechny primery BIOTYPE jsou navrženy tak, aby tyto artefakty minimalizovaly. Tvorbu artefaktů dále snižuje závěrečný exhalací krok protokolu PCR při 68 °C po dobu 60 minut. Výška píku artefaktu koreluje s množstvím DNA. Laboratoře by měly definovat své individuální mezní hodnoty pro analýzu píků.

Nepřesnosti při pipetování

Analýza robustnosti Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit ukázala, že sada je odolná vůči malým odchylkám od popsání protokolu (odchylka +/- 10 %). Průměrná odchylka (+/- 20 %) od popsání protokolu může být kritičtější pro analýzu smíšeného chimérismu (zejména při nízkém podílu chimérismu). Zvláštní pozornost je třeba věnovat Reaction Mix A . Odchylka - 20 % při pipetování tohoto pufru může vést ke značnému snížení úrovně signálu nebo dokonce k nedetekovatelnosti markerů. Pro minimalizaci

případných odchylek doporučujeme používat kalibrované pipety, přesné pipetování a důkladné míchání.

Odlehlé hodnoty

K vyhodnocení standardní odchylky jednotlivých markerů (SD_{Marker}) se doporučuje analyzovat odlehlé hodnoty jednotlivých markerů. Pokud SD_{Marker} překročí 4 % u vzorků s nízkým smíšeným chimérismem (< 5 % MC) a 10 % u vzorků se středním až vysokým smíšeným chimérismem (> 5 % MC), zvažte opětovnou analýzu hodnot MC bez této specifické odlehlé hodnoty. Pokud jsou po vyloučení odlehlých hodnot analyzovány méně než tři markery, opakujte PCR.

Hodnocení výkonu

Analytická specifičnost

Testovali jsme automatické přiřazení alel pomocí alelického žebříčku a shodu přiřazení alel ve srovnání s předběžným typováním testované DNA pomocí jiných metod (jiné PCR sady, přímé sekvenování atd.) pomocí softwaru GeneMapper™ ID-X. Na základě výsledků se určí analyzačně-specifické nastavení přístroje pro genotypizaci pomocí kapilární gelové elektroforézy (Bins a Panels) a podíl stutter píků pro analýzu templátu genového analyzátoru.

Hodnotili jsme 80 předem charakterizovaných vzorků DNA, které byly analyzovány pomocí Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit. Byly stanoveny kompletní profily s výškou píku ≥ 200 RFU. Po určení specifických nastavení přístroje pro analýzu byl všem vzorkům DNA přiřazen správný genotyp pro všechny systémy STR a marker amelogenin. Kromě toho jsme pro každý STR marker vypočítali (Power of Discrimination, PD) na základě frekvencí alel všech analyzovaných vzorků DNA. Všechny STR markery dosáhly PD vyšší než 0,9, což svědčí o vysoké rozlišovací síle Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit.

Tabulka 15 Rozlišovací síla (Power of Discrimination, PD) na základě frekvence alel 80 vzorků DNA

Marker	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

Interference a křížové reakce

Potenciální rušivé faktory, které by mohly ovlivnit výsledky postupu měření, byly analyzovány v souladu s doporučeními pokynů CLSI EP07 (3. Edice), EP37 (1. Vydání). Pro Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit byly stanoveny endogenní a exogenní interferenty, byla testována jejich maximální očekávaná koncentrace (C_{max}) v reakci PCR, jak je navrženo v pokynech, a pokud byla pozorována interference, byly testovány další koncentrace, aby se určila koncentrace, při které není interference detekovatelná.

Výsledky neprokázaly žádný rušivý vliv endogenní interferující krve testované 2,57E- 03 % v/v v reakci PCR na měření úplného profilu DNA jednoho genotypu. Kromě toho byly odchylky od neošetřené skupiny u vzorků se smíšeným chimérismem naměřené 2 %, 5 % a 30 % MC v mezích přesnosti, a neovlivnily tak reakci PCR. Kontaminaci krví však lze vizuálně zjistit v reakci PCR nebo v izolované suspenzi DNA podle oranžového barevného posunu. Pokud je pozorována změna barvy, doporučujeme izolaci DNA opakovat, aby se zabránilo možné interferenci.

Z exogenních rušivých faktorů nevykazovaly EDTA, etanol, kyselina acetylsalicylová, metoklopramid a cyklosporin rušivý účinek při jejich příslušných maximálních koncentracích C_{max} , kdy bylo možné dosáhnout měření kompletního profilu jednoho genotypu DNA XY1726. Odchytky od neošetřené skupiny pozorované u vzorků se smíšeným chimérismem při 2 %, 5 % a 30 % MC byly v mezích přesnosti.

Bylo zjištěno, že exogenní interferenty citrát sodný, heparin, proteináza K a methotrexát interferují u C_{max} doporučeného CLSI EP37 (1. vydání). Další ředění byla testována tak dlouho, dokud nebyla zjištěna žádná další interference. Nebyla pozorována žádná interference s citrátem sodným $8,23E-06$ % v/v, heparinem $2,36E-02$ mg/dL, proteinázou K $3,22E-06$ % v/v a methotrexátem 6,8 mg/dL.

Pomocí doporučených izolačních sad byly testovány také krevní antikoagulanty EDTA, citrát sodný a heparin. Nebyl zjištěn žádný vliv na analytický výkon. Předpokládáme, že pracovní postup s izolačními sadami vyloučí testované interferující látky z antikoagulancií a činidel pro izolaci DNA. Chemoterapeutikum methotrexát nevykazovalo při testované koncentraci žádnou interferenci ve srovnání s referenční prázdnou hodnotou.

Tabulka 16 Testované koncentrace endogenních a exogenních interferujících faktorů.

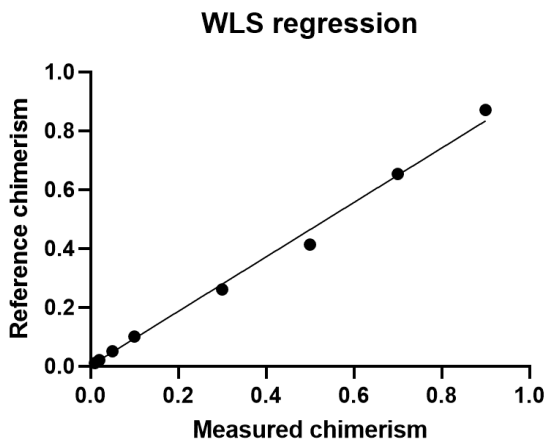
Druh interferentu	Kategorie	Interferent	Neinterferujících koncentrace
Endogenní	Složky plné krve	Plná krev	2,57E- 03 % v/v v reakci PCR
Exogenní	Antikoagulanty	EDTA	0,099 mg/dL
		Sodík, citrát	8,23E- 06 % v/v v PCR
		Heparin	2,36E- 02 mg/dL
		Proteináza K	3,13E- 04 % v/v v reakci PCR
	Izolační činidlo DNA	Etanol	2.70E- 03 % v/v v reakci PCR
	Analgetika a antipyretika	Aspirin (kyselina acetylsalicylová)	3 mg/dL
	Antiemetikum	Metoklopramid	0,225 mg/dL
	Chemoterapeutikum	Methotrexát	6,8 mg/dL
	Imunosupresivní látka	Cyklosporin	0,18 mg/dL

Analytická citlivost

Lidská gDNA s jedním genotypem je měřitelná v rozmezí 0,125 ng až 2,00 ng. V tomto rozsahu lze bezchybně měřit kompletní profily všech STR markerů a amelogeninu. Jako optimální vstupní množství DNA jednoho genotypu pro přijatelnou analýzu celého profilu s menší spotřebou materiálu doporučujeme 0,50 ng. Pro detekci smíšeného chimérismu s optimální citlivostí jsme testovali různá vstupní množství. Abychom se vyhnuli efektu nasycení signálu při vysokých vstupních úrovních nebo snížené citlivosti při nízkých vstupních úrovních, definovali jsme 1,00 ng DNA jako optimální vstupní úroveň pro detekci smíšeného chimérismu.

Linearita byla stanovena na základě instrukce CLSI-EP06Ed2 (2. vydání). Linearita byla testována pomocí šesti různých směsných vzorků chimér.

Vzorky byly vybrány tak, aby byly alespoň jednou zaznamenány všechny STR markery a amelogenin jako analyzovatelný marker pro analýzu smíšeného chimérismu. Každý směsný vzorek chimér byl naředěn tak, aby pokryl chimérismus příjemce od 1 % do 90 % (1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 %). Přijatelná odchylka od linearity (ADL) byla definována jako 2 % pro vzorky s chimérismem příjemce do 5 %, aby byly v tomto rozsahu povoleny pouze malé odchylky. Pro chimérismus příjemce > 5 % byla ADL nastavena na 10 %, aby se umožnily průměrné odchylky od linearity. Očekávané a předpokládané hodnoty byly u všech vzorků nižší než ADL, což potvrzuje linearitu pro testovaný rozsah měření chimérismu.



Obrázek 2 Příklad vážené lineární regrese různých koncentrací chimér pro směs chimér.

Výsledkem regrese byl koeficient determinace 0,9947, což potvrzuje vysoký stupeň linearity mezi naměřenými a očekávanými hodnotami v celém rozsahu testu od 1 % do 90 % chimérismu příjemce (osa x: naměřený chimérismus, osa y: referenční hodnota chimérismu)

Kromě toho byla testována linearita každého jednotlivého markeru, který lze detekovat pomocí Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit v rozsahu chimérismu příjemce od 1 % do 90 %. Všechny markery vykazují přijatelnou linearitu v celém rozsahu.

Limit of Blank (LoB) byla testována na 31 DNA jednoho genotypu ve třech různých dnech se dvěma různými šaržemi sady. LoB pro smíšený chimérismus byl vypočten pomocí neparametrického přístupu CLSI - EP17-

A2 ($\alpha = 0,05$, 2. vydání). Analyzovány byly pouze informativní markery. Výsledek potvrdil nulovou hodnotu LoB pro obě šarže.

S použitím 1,00 ng DNA jsme testovali tři různé vzorky smíšeného chimérismu s koncentracemi od 0,50 % do 3,00 %. Všechny vzorky byly testovány dvěma různými šaržemi sady. Analyzovány byly pouze informativní markery. Probitová analýza (CLSI - EP17-A2, 2. vydání) s hladinou spolehlivosti 95 % poskytla mez detekce (LoD) 1,07 % pro šarži 1 a 1,36 % pro šarži 2. Výsledná LoD je 1,36 % smíšeného chimérismu. Při použití informativních markerů a dalších n+1 shutterů pro analýzu se LoD sníží na 4,31 %.

Při použití doporučeného minimálního počtu tří informativních markerů nebyla výsledná mez detekce (LoD) ovlivněna ve srovnání s LoD získanou při použití všech dostupných informativních markerů.

Tabulka 17 LoD pro Mentype® Chimera® PCR-Amplifikationskit s použitím informativních markerů

Šarže	LoD (% smíšeného chimérismu)	Ncelkem
Šarže 1	1,36 %	315
Šarže 2	1,07 %	315

Cílová hodnota přesnosti pro limit kvantifikace byla stanovena v souladu s CLSI - EP17-A2 (2. vydání). Pro detekci chimérismu na LoD jsme definovali přesný cíl pomocí Westgardova modelu ($TE = |bias| + 1,96 s$; (Westgard et al. 1974 [17])) a bias a přesnost analýzy. Testovali jsme šest různých vzorků se smíšeným chimérismem s 2,00 % smíšeného chimérismu ve třech různých dnech. Výsledná souhrnná směrodatná odchylka 1,15 % byla nižší než cílová hodnota přesnosti založená na TE, která činí 1,59 %, což potvrzuje přijatelnou přesnost na úrovni LoD.

Přesnost

Nepřesnost a zkreslení se mohou lišit podle obsahu chimér. Došli jsme k závěru rozdělit rozsah smíšeného chimérismu (MC) do tří intervalů, které popisují také Pettersson et al. (2021) [18] a definovat přizpůsobená kritéria přijatelnosti pro každý interval. Intervaly jsou následující:

- Nízký MC s < 5 % podílem druhého genotypu
- Střední MC s 5-20 % podílem druhého genotypu
- Vysoký MC s > 20 % podílem druhého genotypu

Přesnost byla analyzována na základě pokynu CLSI-EP21Ed2E (2. vydání). K výpočtu hodnoty sigma na základě metriky sigma (Westgard et al. 2018) [19] byla použita odchylka naměřená ve srovnání s referenčním materiálem a nepřesnost (reprodukovatelnost) naměřená ve studii s více pracovišti. Celková přijatelná chyba byla stanovena na základě odhadů zkreslení ze studie linearity a uváděné nepřesnosti pro analýzy PCR založené na STR pro analýzu chimérismu (Pettersson et al. 2021) [18]. Výsledné hodnoty sigma vykazovaly dobrou přesnost pro nízký interval MC a vynikající přesnost pro střední až vysoký interval MC.

Tabulka 18 Hodnoty Sigma pro smíšený chimérismus

Vzorek	Hodnota Sigma
2% smíšený chimérismus	4,42
5% smíšený chimérismus	5,21
30% smíšený chimérismus	5,35

Pravdivost

Hodnocení zkreslení bylo založeno na referenčním materiálu od tří různých poskytovatelů zkoušek způsobilosti (3 různé programy externí kontroly kvality). Zkreslení bylo vypočteno pro rozdíl mezi výsledkem Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit a referenční hodnotou:

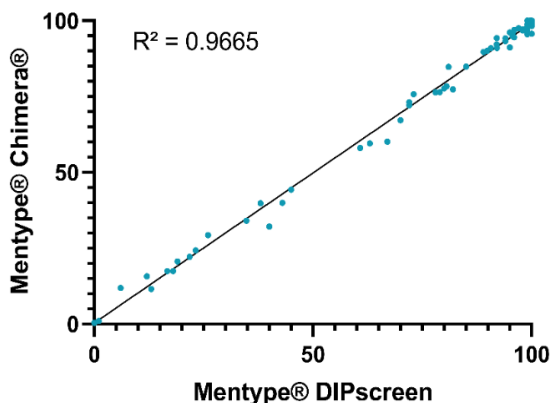
$$\Delta MC = ReferenceMC - MentypeChimeraMC$$

Výpočet odchylky vychází ze směrnice CLSI-EP09Ed3cE (3. vydání) a používá průměr hodnot ΔMC , protože bylo prokázáno normální rozdělení (Shapiro-Wilkův test normality, $\alpha = 0,05$). Podle referenčních hodnot byly vzorky rozděleny do tří dílčích intervalů pro MC (oddíl Přesnost). Výsledná odchylka se pohybovala mezi - 0,42 a 0,11.

Tabulka 19 Zkreslení (průměr ΔMC) pro nízké, střední a vysoké MC

	nižší MC (< 5 %)	Střední MC (5 - 20 %)	vyšší MC > (20 %)
Zkreslení (průměr ΔMC)	- 0,18	0,11	- 0,42

Kromě vyhodnocení zkreslení jsme porovnali Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit s referenční metodou. Referenční metoda založená na PCR Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit analyzuje polymorfismy DNA DIP a rozlišuje dva jedince (genotypy). Obě metody byly měřeny na 95 vzorcích pacientů s různými úrovněmi smíšeného chimérismu. Výsledný koeficient determinace 0,9665 potvrzuje vysokou korelaci mezi oběma metodami.

**Obrázek 3 Srovnání referenčních metod Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit a Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit.**

Lineární regrese na pravé straně ukazuje přijatelnou korelaci s koeficientem determinace 0,9665.

Přesnost

Testovali jsme opakovatelnost a reprodukovatelnost analýz na základě norem ISO 5725-2:2022-05 a CLSI - EP05 (3. vydání) Smíšené vzorky chimérismu pokrývající rozsah měření chimérismu (2 %, 5 %, 30 %, 70 %) byly analyzovány ve studii 8 x 5 x 3 (den x opakování x místo) na více místech. Opakovatelnost pro smíšený chimérismus se pohybovala mezi 0,63 % a 1,79 % směrodatné odchylky (SD) pro smíšený chimérismus a reprodukovatelnost mezi 0,72 % a 1,80 % SD pro smíšený chimérismus.

Mezní hodnota pro analýzu (Cut-off)

Vyhodnotili jsme mezní hodnotu analýzy pro Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit na základě výpočtu frekvencí alel různých amplifikovaných markerů. Vzorky přibližně 210 evropských jedinců byly znovu analyzovány pomocí Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit . Výsledné frekvence alel byly použity k výpočtu specifických parametrů diskriminace STR, které jsou důležité i pro analýzu chimérismu, jako je informační obsah polymorfismu (PIC), očekávaná heterozygotnost (HET) a diskriminační síla (PD), která udává schopnost genetického markeru nebo skupiny markerů rozlišovat mezi různými jedinci v rámci populace. PD pro všechny markery se pohybuje mezi 0,856 a 0,990, což technicky umožňuje rozlišit dva jedince na základě alespoň jednoho markeru, ale PD se zvyšuje při použití více markerů v kombinaci.

Celkově lze říci, že Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit umožňuje vysokou pravděpodobnost rozlišení dvou jedinců (s výjimkou jednovaječných dvojčat) na základě variability markerů, informačního potenciálu každého markeru a kombinovatelnosti různých markerů.

Tabulka 20 Diskriminační pravděpodobnost všech markerů pbsažených v Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit. PIC, PD a HET byly vypočteny pro každý marker na základě analýzy přibližně 210 evropských jedinců

Marker	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
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

Stabilita při použití

Všechny studie stability byly naplánovány v souladu s normou ISO 23640:2015 a pokynem CLSI EP25. Při všech studiích stability byl použit následující postup: Sada Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit byla testována v několika časových bodech v různých časových obdobích. Vzorky chimérismu byly analyzovány pomocí ChimerisMonitor IVD, přičemž jediný genotyp DNA XY1726 a XX1180 představovaly příjemce a dárce.

Analyzovali jsme vzorky DNA jednoho genotypu XY1726 se vstupem DNA 0,5 ng a vzorky smíšeného chimérismu (MC) XY1726:XX1180 (příjemce:dárce) se vstupem DNA 1 ng, což představuje různé intervaly MC 2 %, 5 % a 30 % MC. Pro výpočet chimérismu příjemce směsi

XY1726:XX1180 bylo použito 7 analyzovatelných informativních a n+1 shutter markerů.

Konečné hodnocení různých podmínek zahrnovalo srovnání průměrných hodnot počátečního časového bodu (t_0) a různých časových bodů (t_n) a bylo vypočteno pomocí následující rovnice:

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

Pro studii stability při používání byly provedeny dva experimenty. Jeden pro testování stability po zmrazení a rozmrazení a druhý pro testování stability sad během simulovaného použití po otevření. Všechny vzorky testované v rámci experimentu stability při použití měly úplný profil markeru pro jediný genotyp DNA XY1726 a byly pod mezí přesnosti a preciznosti analýzy na základě celkové chyby pro tři testované vzorky MC: 30 %, 5 %, 2 % MC s mezními hodnotami 3,14 %, 1,99 % a 1,59 %.

Podle výsledků je souprava Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit po prvním otevření stabilní až 22 měsíců a stabilní až 20 cyklů zmrazení a rozmrazení.

Údaje o klinickém výkonu

Design studie, etické a regulační aspekty

Sada Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit a referenční metody byly testovány na vzorcích pacientů podle alo-HSCT. Deset pacientů zařazených do této studie bylo podle alo-HSCT sledováno a obsah dárcovských vzorků byl během sledování analyzován 10krát po alo-HSCT. Cílem této studie bylo poskytnout klinické důkazy v souladu s § 20 až 24 německého zákona Medizinproduktgesetz (MPG ve znění ze dne 7. srpna 2002 (BGBl. I S 3146)). Pomocí cytogenetické referenční metody FISH bylo třeba prokázat shodu s metodou PCR založenou na STR sady. Potvrzení od příslušné etické komise bylo obdrženo 14. března 2012.

Referenční metody

Jako referenční metoda byla provedena fluorescenční in situ hybridizace (FISH) pomocí sady CE-IVD CEP® X SpectrumOrange™ / Y SpectrumGreen™ Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden). Aby bylo možné použít referenční metodu, byly do

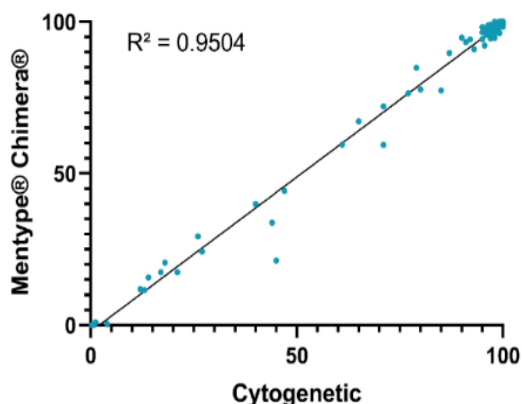
studie zahrnuty pouze páry dárce a příjemce různého pohlaví. V souladu s doporučeními výrobce byly analyzovány pouze cytogenetické výsledky s počtem buněk > 200.

Extrakce a purifikace DNA

DNA byla izolována pomocí sady QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE). Izolace byla provedena v souladu s protokolem výrobce.

Výsledky

Vysoká korelace mezi QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE) a referenční cytogenetickou metodou s $R^2 = 0,9504$ potvrzuje použitelnost pro sledování chimérismu podle alo-HSCT.



Obrázek 4 Souvislost mezi výsledky cytogenetiky a Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit je znázorněna v grafu.

Lineární regrese vykazuje přijatelnou korelaci s koeficientem determinace 0,9504 (N = 93).

Výsledná shoda 94,62 % (akceptováno 5 % Δ MC) s výsledky referenční metody potvrzuje spolehlivost Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit pro interpretaci klinických dat.

Diagnostické vyhodnocení

Klinické výkonnostní charakteristiky vykazovaly přijatelné výsledky. Výsledky byly vyhodnoceny ve vztahu k LoD PCR a cytogenetiky 1 % (Bader et al. 2023) [20]. Bylo zjištěno, že parametry pro hodnocení klinického výkonu podle bodu 9.1b dodatku I IVDR nejsou pro sadu Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit plně použitelné. Sada monitoruje rozsah analytu, nikoliv přítomnost analytu. Proto nelze posouzení negativního a pozitivního stavu analytu plně použít.

Tabulka 21 Diagnostické charakteristiky

Diagnostické charakteristiky	Odhad	Dolní konfidenční interval	Horní konfidenční interval
Diagnostická citlivost	89,8 %	82,1 %	97,5 %
Diagnostická specifita	85,3 %	73,4 %	97,2 %
Diagnostická přesnost	88,2 %	81,6 %	94,7 %
Pozitivní prediktivní hodnota	91,4 %	84,2 %	98,6 %
Negativní prediktivní hodnota	82,9 %	70,4 %	95,3 %
Prevalence	63,4 %	53,7 %	73,2 %

Kontrola kvality

Všechny součásti sady procházejí intenzivním procesem kontroly kvality ve společnosti BIOTYPE GmbH. Kvalita testovací sady je neustále sledována, aby byla zajištěna její neomezená použitelnost. V případě jakýchkoli dotazů týkajících se zajištění kvality nás prosím kontaktujte.

Technická podpora

Pro technické poradenství se obraťte na naši Customer Support:

E-mail: support@biotype.de

Telefon: +49 (0)351 8838 400

Reference

- [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., & Klitschar, 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

Omezení používání

- Postupy uvedené v tomto návodu k použití je třeba dodržovat podle popisu. Jakákoli odchylka může vést k neúspěchu testu nebo k nesprávným výsledkům.
- Tento produkt mohou používat pouze profesionální laboratorní uživatelé, kteří jsou speciálně vyškoleni a kvalifikováni v technikách PCR a kapilární gelové elektroforéze.
- Pro optimalizaci tohoto testu jsou nutné vhodné postupy pro odběr, přepravu, skladování a zpracování vzorků.

- Sada byla validována pouze pro použití se vzorky lidské periferní žilní plné krve provedené na přístrojích uvedených v oddílu Přístroje a software.
- Tato analýzy se nesmí provádět přímo na vzorku. Před použitím této analýzy je třeba provést vhodné postupy extrakce nukleových kyselin.
- Sada byla validována pouze se ssadami pro extrakci a purifikaci DNA popsány v oddílu Činidla, sady a spotřební materiál.
- K zajištění funkčnosti sady je nutná správná laboratorní praxe.
- Výsledky musí být interpretovány po konzultaci s klinickými lékaři, kteří kombinují výsledky analýz chimérismu s výsledky dalších metod relevantních pro terapii nebo diagnózu.
- Při interpretaci výsledků je třeba vzít v úvahu možnost falešně negativních a falešně pozitivních výsledků.
- Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit nelze použít, pokud jsou dárce a příjemce jednovaječná dvojčata.
- Dvojitá transplantace nebyla v rámci hodnocení výkonnosti validována.
- Vzorky obsahující degradovanou DNA mohou ovlivnit schopnost detekce lokusů STR a pohlavně specifických lokusů.
- Nepoužívejte prošlé nebo nesprávně skladované součásti.
- Analýza chimérismu byla validována pouze pomocí informativních markerů specifických pro pacienta pro všechny oblasti chimérismu nebo volitelně pomocí dalších n+1 markerů specifických pro pacienta pro oblasti se středním až vysokým smíšeným chimérismem (> 5 %). Použití n-1 markerů nebo neinformativních markerů není podporováno.
- Vzorky z různých etnických skupin mohou mít odlišné genetické vlastnosti, například různé frekvence alel, což by mohlo omezit diskriminaci nebo amplifikaci. Byla vyhodnocena frekvence alel STR markerů v několika populacích. Kombinovaná rozlišovací schopnost alespoň dvou markerů je vysoká a dosahuje hodnot vyšších než 0,99. To naznačuje relativně nízké riziko, že se test u pacienta setká s problémy s amplifikací. Údaje o populaci jsou však v současné době k dispozici pouze pro bělošské a asijské skupiny. Potenciální dopad na ostatní etnické skupiny nelze odhadnout.

Vzhledem ke genetické variabilitě mohou mikrosatelity, jako jsou jednonukleotidové polymorfismy (SNP), zhoršovat účinnost primerů nebo přístupnost templátu. Analýza nejnovější verze lidského genomu (HG38) však neodhalila žádné klinicky relevantní SNP v žádné z populací.

Informace k objednávce

Objednávky zasílejte e-mailem na adresu sales@biotype.de.

Produkt	Velikost balení	Objednací číslo
Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit	25 reakcí	45-12200-0025
	100 reakcí	45-12200-0100
	400 reakcí	45-12200-0400
Matrix Standard BT5 multi	1 x 25 µL	45-15100-0025
	2 x 25 µL	45-15100-0050
ChimerisMonitor IVD	Demo licence licence na 1 rok licence na 3 roky	46-14800-0000

POZNÁMKA



Jednotlivé komponenty sady nelze objednat a zakoupit samostatně

Ochranné známky a prohlášení o vyloučení odpovědnosti

Mentype® a Chimera® jsou registrované ochranné známky společnosti BIOTYPE GmbH.

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

PCR je chráněna patenty. Držiteli patentu jsou společnosti Hoffmann-La Roche Inc. a F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Registrovaná jména, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, i když nejsou výslovně takto označeny, nelze považovat za právně nechráněné.

Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit je diagnostická sada s označením CE podle evropského nařízení o diagnostice in vitro (EU) 2017/746.

Výrobek není ze strany Health Canada licencován a není schválen ani povolen FDA.

Není k dispozici ve všech zemích.

Pouze z důvodu lepší čitelnosti byly vypuštěny údaje týkající se pohlaví a vícenásobná označení. Všechna osobní označení je proto třeba chápat jako genderově neutrální.

© 2025 BIOTYPE GmbH; všechna práva vyhrazena.

Vysvětlení symbolů



Výrobce



Šarže



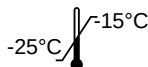
Dostatečné pro zkoušky <N>



Dodržujte návod k použití (eIFU)



Lze používat do



Omezení teploty



Číslo produktu



Diagnostika in vitro



Chraňte před slunečním zářením



Skladujte na suchém místě



Jedinečný identifikátor produktu

Další označení použita v tomto návodu k použití:



modře podtržený text

černě podtržený text

odsazený, kurzíva, tučný text

Užitečné tipy

Věnujte prosím pozornost této poznámce!

Odkazy, které vedou na externí obsah, jako jsou domovské stránky nebo e-mailové adresy

Křížové odkazy v dokumentu pro snadnou navigaci

Pole, na která je třeba kliknout v softwaru

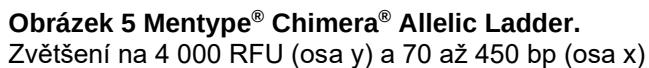
Dodatek

Elektroferogramy referenčních vzorků

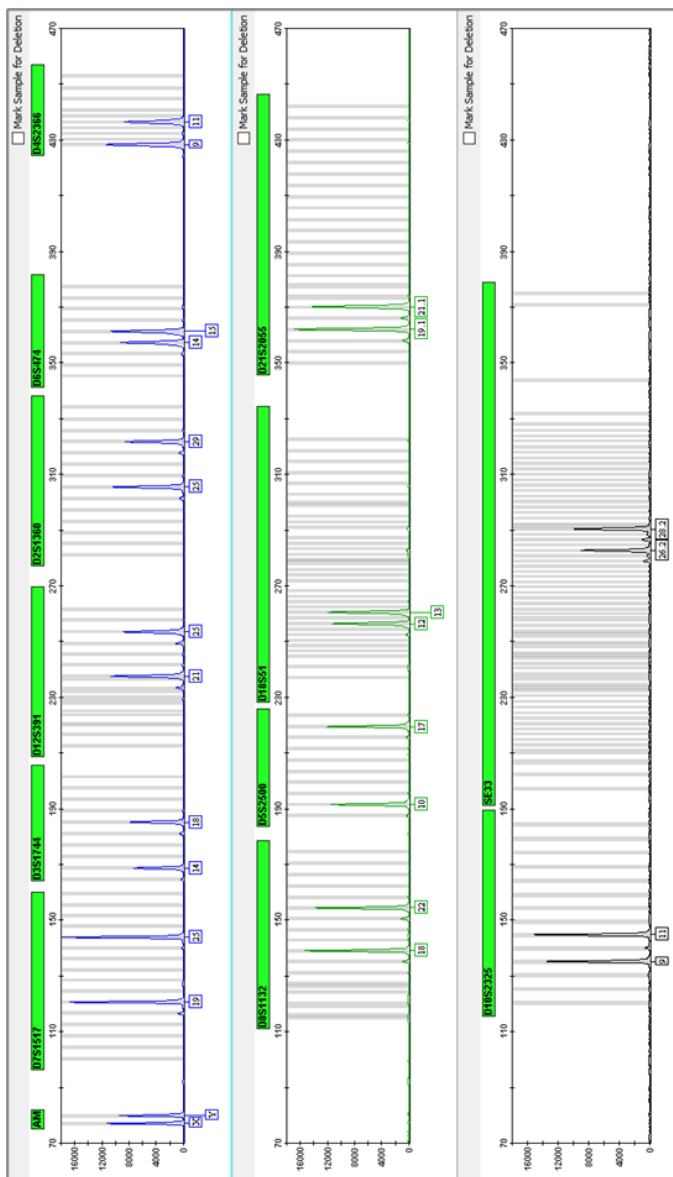
Na následujících stránkách najdete příklady elektroferogramů Mentype® Chimera® Allelic Ladder ([Obrázek 5](#)), Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 (PC, [Obrázek 6](#)) a No Template Control (NTC, [Obrázek 7](#)).

Všechny vzorky byly amplifikovány na ProFlex PCR Cyclor a analyzovány na Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer (POP-4™ analýza 36 cm) s použitím validovaných parametrů procesu. Analýza dat byla provedena pomocí programu GeneMapper™ ID-X verze 1.6. Byly použity templáty Bins, Panels, Stutter a metoda analýzy podle [Tabulka 13](#).

Elektroferogramy jsou zvětšeny na délku fragmentu 70 - 480 bp (osa x). Obecné rozmezí pro analýzu délky fragmentu (osa x) pomocí Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit je mezi 50 bp a 550 bp. Osa y byla škálována individuálně podle popisu pod každým obrázkem (viz [Obrázek 5](#), [Obrázek 6](#), [Obrázek 7](#))

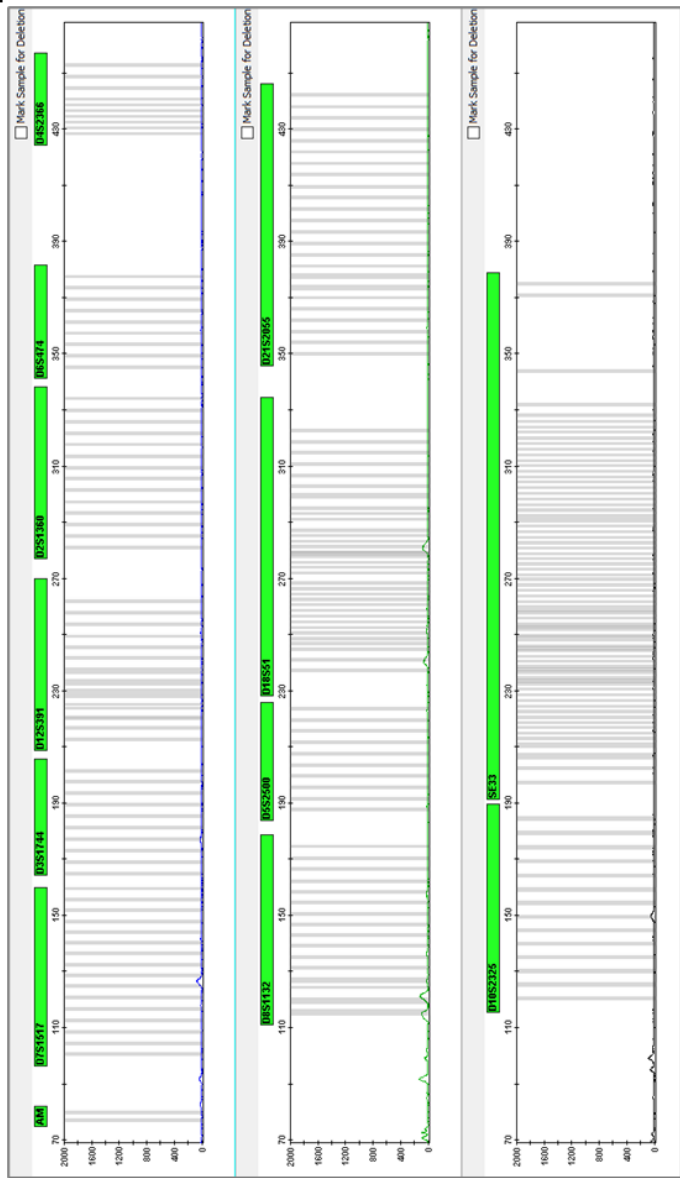


Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 (PC)



Obrázek 6 Mentype® Chimera® Control DNA XY1726 (PC).
Zvětšení na 18 000 RFU (osa y) a 70 až 450 bp (osa x)

No Template Control NTC



Obrázek 7 No Template Control (NTC) Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit.

Zvětšení na 2 000 RFU (osa y) a 70 až 450 bp (osa x)

Délky fragmentů a alely

Tabulka 22 - Tabulka 25 uvádí délky fragmentů jednotlivých alel, které se vztahují k DNA Size Standard 550 (BTO) . Všechny analýzy byly provedeny na ABI PRISM® 310/3130 Genetic Analyzer s polymerem POP-4™. Různé analyzátoři, standardy velikosti DNA nebo polymery mohou vést k různým délkám fragmentů. Kromě toho se doporučuje vizuální srovnání s žebříkem v uličce.

Poznámky v Tabulka 22 - Tabulka 25:

* zaokrouhleno na celé číslo

**Off-Ladder alely z BIOTYPE DNA fondu jsou přiřazeny aktuálními BIOTYPE soubory templátů pro GeneMapper™ ID-X. Další alely viz např. <https://strbase.nist.gov/>

‡ Pro lepší orientaci jsou tyto alely v alelickém žebříčku zvýrazněny.

Tabulka 22 Délky fragmentů Mentype® Chimera® Allelic Ladder analyzované na ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer pomocí POP-4™ polymeru (modrý panel)

Marker/ Alela	Velikost [bp]*	Další Alely **	Marker/ Alela	Velikost [bp]*	Další Alely **	Marker/ Alela	Velikost [bp]*	Další alely **
Amelog enin	6-FAM		D12S391	6-FAM		D6S474	6-FAM	
X	77		15	213		13	354	11, 12
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	9.2
22	132		25	254		10	433	10.2
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				
21	198	22	32	334				

Tabulka 23 Délky fragmentů Mentype® Chimera® Allelic Ladder analyzované na ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer pomocí POP-4™ polymeru (zelený panel)

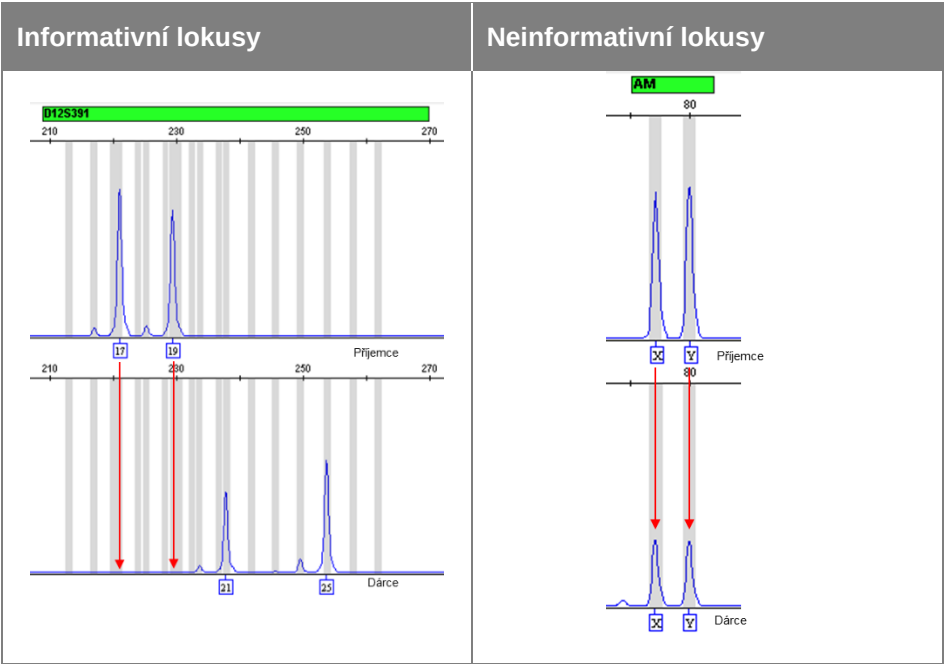
Marker/ Alela	Velikost [bp]*	Další alely**	Marker/ Alela	Velikost [bp]*	Další alely**	Marker/ Alela	Veliko st [bp]*	Další alely**
D8S1132	BTG		D18S51	BTG		D21S2055	BTG	
12.1	117	12, 13	8	241	7	16.1	351	
13.1	121		9	245	9.2	17.1	355	
14.1	125	14.3	10	249		18.1	359	
15	128		10.2	251		19.1	363	
16	132		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							
17	220							
18	224							

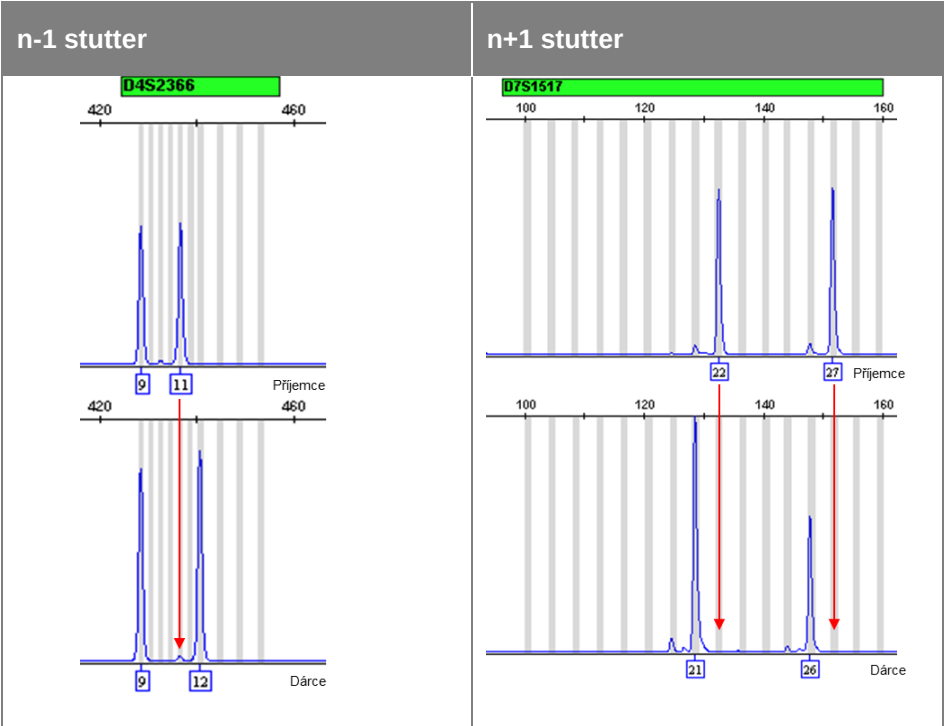
Tabulka 24 Délky fragmentů Mentype® Chimera® Allelic Ladder analyzované na ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer pomocí POP-4™ polymeru (žlutý panel)

Marker/ Alela	Velikost [bp]*	Další alely**	Marker/ Alela	Velikost [bp]*	Další alely**	Marker/ Alela	Velikost [bp]*	Další alely**
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				

Příklady kvalitativního hodnocení lokusů

Tabulka 25 Příklady kvalitativního hodnocení lokusů





BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Telefon: +49 351 8838 400

Fax: +49 351 8838 403

www.biotype.de

Objednávka

sales@biotype.de

Zákaznický servis a podpora

support@biotype.de

