

Mentype[®] DIPscreen

PCR Amplification Kit

Návod k použití (IFU)



0483

Pro diagnostické použití in vitro

DISIFU02v2cz

05.09.2025



45-12300-0025

45-12300-0100



Kód šarže



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

Webové stránky: www.biotype.de

E-mail: support@biotype.de

Objednávání: sales@biotype.de



Upozornění na změnu

Vezměte prosím na vědomí následující úpravy oproti předchozí verzi IFU:

Kód dokumentu	Změny	Datum
DISIFU02v1cz	Původní verze	21.03.2025
DISIFU02v2cz	Doplnění k řešení rušivých vlivů v kapitole Omezení použití	05.09.2025

Tištěnou verzi tohoto IFU vám můžeme poskytnout zdarma do 7 dnů.
V případě dotazů nebo jakýchkoli dalších otázek nás prosím kontaktujte:
na čísle +49 351 8838 400 nebo

support@biotype.de

Obsah

Zamýšlený účel	4
Vědecké pozadí	4
Popis produktu.....	5
Poskytnuté materiály	7
Obsah soupravy	7
Popis komponent	8
Skladování činidel a manipulace s nimi	9
Požadovaný, ale neposkytnutý materiál a prostředky	9
Všeobecné laboratorní vybavení.....	9
Činidla, soupravy a spotřební materiál.....	10
Přístroje a software	11
Vzorky a zkušební vzorky	12
Upozornění a bezpečnostní opatření.....	13
Upozornění pro uživatele	14
Procedura	14
Přehled experimentálního pracovního postupu	14
Příprava vzorku	15
Požadavky na surový vzorek.....	15
Extrakce DNA	15
Kvantifikace a ředění DNA	16
Skladování DNA	16
Příprava kontroly	17
Pozitivní kontrola PC	17
Kontrola bez templátu NTC	17
Nastavení master mixu	17
PCR amplifikace.....	19
Kapilární gelová elektroforéza.....	20
Příprava produktů PCR	20

Analýza délky fragmentu	22
Analýza dat	24
Obecná procedura analýzy dat	24
Validace běhu pracovního postupu	25
DNA Size Standard 550 (BTO).....	25
Allelic Ladder Mentype® DIPscreen	26
Control DNA XY82 (PC)	26
Kontrola bez templátu NTC	27
Analýza vzorku	28
Analýza dat pracovního postupu	28
Kvalitativní analýza – identifikace informativních lokusů	29
Semikvantitativní analýza – analýza chimérismu.....	29
Analýza dat pomocí softwaru ChimerisMonitor IVD.....	31
Analýza dat pomocí softwaru GeneMapper™ ID-X	33
Příprava softwaru GeneMapper™ ID-X.....	33
Řešení problémů.....	36
Hodnocení funkční účinnosti	38
Údaje o klinické funkční účinnosti	47
Kontrola kvality	50
Technická pomoc	50
Reference.....	50
Omezení použití	51
Informace k objednávání.....	52
Ochranné známky a prohlášení o vyloučení odpovědnosti.....	53
Vysvětlení symbolů	54
Příloha	56

Zamýšlený účel

Souprava Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit je manuální test určený k použití s genomovou DNA extrahovanou ze vzorků periferní žilní plné krve odebraných dospělým pacientům s leukémií, kteří podstoupili alogenní transplantaci krvetvorných kmenových buněk (alo-HSCT).

Souprava Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit detekuje 33 delečně inserčních polymorfismů (DIP) a amelogenin v jedné multiplexní PCR reakci. Před HSCT se tyto polymorfismy používají ke kvalitativnímu screeningu genotypů pacienta a dárce a k identifikaci DIP alel specifických pro pacienta. Tyto informativní alely jsou analyzovány za účelem semikvantitativního monitorování chimérismu po alo-HSCT.

Souprava Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit je určena pro profesionální uživatele vyškolené v molekulárně-genetických technikách, multiplexní PCR a v manipulaci s Genetic Analyzers společnosti Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems division).

Vědecké pozadí

Alogenní transplantace krvetvorných buněk (alo-HSCT) je léčebnou metodou, která umožňuje vyléčit pacienty s nenádorovými i nádorovými hematologickými onemocněními, jako je například leukémie. Analýza chimérismu se používá ke stanovení směsi dárcových a příjemcových krvetvorných buněk u příjemců alo-HSCT k odhalení časných známek rejekce štěpu. Pro genotypizaci a monitorování se používá lidská periferní žilní krev. Podle pokynů CLSI (MM05-A2 2. vydání) se pro odběr krve doporučují antikoagulanty jako EDTA a citrát. V závislosti na úspěšnosti transplantace se mohou vyvinout různé formy krvetvorného chimérismu (kompletní, smíšený nebo ztrátový). K analýze chimérismu se používají různé přístupy, včetně fluorescenční in situ hybridizace (FISH), polymorfismu délky restrikčního fragmentu (RFLP), analýzy krevního obrazu a metod založených na PCR. Analýza inserce-delece polymorfismů (INDEL nebo DIP) umožňuje semikvantitativní analýzu chimérismu pomocí multiplexních PCR přístupů i kvantitativní analýzu s aplikací specifickou pro alelu na platformách qPCR nebo dPCR. Proto jsou tyto testy DIP nezbytným předpokladem pro citlivé monitorování chimérismu. K odhalení časných

příznaků rejekce štěpu by měla být v pravidelných intervalech a krátce po alo-HSCT prováděna analýza chimérismu.

Popis produktu

Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit je multiplexní amplifikační souprava pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) vyvinutá pro monitorování chimérismu. Pro diskriminaci dárce a příjemce se v jedné PCR reakci současně amplifikují bíalelické inzerce a delece polymorfismů (INDEL nebo DIP) s velmi vysokou mírou heterozygoty a vyváženým rozložením alel na 19 chromozomech (viz [Tabulka 1](#)). Jeden primer pro každý lokus je označen fluoroforem 6-FAM™, BTG nebo BTY. Produkty PCR se poté analyzují pomocí kapilární gelové elektroforézy.

Tabulka 1 Informace specifické pro lokus Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit, HLD = lidský lokus DIP, -DIP = delece, +DIP = inzerce

Lokus DIP	Chromozomální poloha	Lokus DIP
Panel FAM		
AM X	Xp22.1-22.3	
AM Y	Yp11.2	
HLD106	16q13	-/AATGCGT
HLD70	6q16.1	-/AGCA
HLD84	8q24.12	-/CTTTC
HLD103	12q23.1	-/GCTTATAA
HLD104	13q32.1	-/ACTC
HLD116	18p11.22	-/AGGTGTGCAACAACATGATAC
HLD112	17p12	-/TTGTA
HLD307	Xp11.23	-/TCAACCAA
HLD310	2p22.3	-/GTCTGGTT
HLD110	16q22.1	-/TCCCTG
HLD133	3p22.1	-/CAACCTGGATT
HLD79	7q31.2	-/AATCT
HLD105	14q24.3	-/ATAGACAA
HLD140	3q23	-/GGTAGTATGGGCCT
HLD163	12q24.31	-/AACTACGGCACGCCC
Panel BTG		
HLD91	11q14.1	-/GATA
HLD23	18p11.32	-/CTTTAA
HLD88	9q22.33	-/CCACAAGA
HLD101	15q26.1	-/GTAG
HLD67	5q33.3	-/CTACTGAC
HLD301	17q21.32	-/CAGGGGCTC
HLD53	3q22.1	-/ATGT

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

Test byl validován analýzou chimérismu více než 200 příbuzných párů dárce a příjemce se shodou HLA a jeho vhodnost byla potvrzena ve srovnávací klinické hodnotící studii.

Detekční limit pro kvalitativní analýzu je 125 pg genomové DNA.

Vstupní rozsah pro detekci smíšeného chimérismu za standardních podmínek je 1,0 - 2,0 ng gDNA. Optimální vstupní dávka gDNA je 2 ng za standardních podmínek.

Při analýze informativních markerů lze dosáhnout citlivosti 1,4 % LoD₉₅ (limit detekce) při použití 2 ng gDNA jako vstupu. Pro dosažení výše uvedené citlivosti se doporučuje použít co nejvíce informativních markerů.

Poskytnuté materiály

Obsah soupravy

Tabulka 2 Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit obsah

Činidlo	Barva uzávěru		Objem na velikost balení	
			25 reakcí	100 reakcí
Nuclease-Free Water	Světle modrá		1,5 mL	2 × 1,5 mL
Reaction Mix A	Fialová		125 µL	500 µL
Mentype® DIPscreen Primer Mix	Červená		125 µL	500 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Bílá		15 µL	60 µL
Control DNA XY82 (2 ng/µL)	Bílá		10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Oranžová		13 µL	50 µL
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder	Zelená		25 µL	25 µL

Přehled čísel šarží komponent najdete na štítku, který je umístěn na vnitřní straně chlopně krabice.

POZNÁMKA



Vezměte prosím na vědomí, že velikost balení popisuje počet testů **bez zohlednění** počtu požadovaných kontrol nebo požadovaného přebytku pro pipetování.

Pro odpovídající propustnost doporučujeme použít následující velikost:

- < 8 vzorků na jeden běh PCR: velikost balení 25 reakcí
- ≥ 8 vzorků na jeden běh PCR: velikost balení 100 reakcí

Popis komponent

Nuclease-Free Water: Voda PCR třídy, která se používá v PCR sestavě a jako kontrola bez templátu (NTC).

Reaction Mix A: PCR pufr obsahující dNTP a $MgCl_2$. PCR pufr je optimalizován tak, aby podporoval aktivitu enzymů pro PCR.

Mentype® DIPscreen Primer Mix: multiplexní směs oligonukleotidových primerů obsahující značené primery (značení: 6-FAM™, BTG, BTY) a neznačené primery.

Multi Taq 2 DNA Polymerase: taq DNA Polymerase s horkým startem, 2,5 U/ μ L.

Control DNA XY82 (2 ng/ μ L): genomová DNA izolovaná z krve EDTA od jednoho lidského dárce mužského pohlaví. DNA se použije jako kvalitativní externí pozitivní kontrola pro soupravu Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit.

POZNÁMKA

i

Control DNA XY82 není pro laboratorní odborníky kritická, protože se skládá z jednotlivých molekul DNA, které byly přečištěny, nejsou nebezpečné a nemají aktivní biologické funkce. Neobsahuje žádné živé buňky ani patogenní organismy, které by mohly představovat přímou hrozbu.

DNA Size Standard 550 (BTO): směs fluoroforem značených PCR fragmentů s definovanou délkou fragmentu mezi 60 – 550 bp, komponenta se přidává ke každému PCR produktu před analýzou délky fragmentu, používá se pro velikostní regresi k přesnému určení délky fragmentu PCR produktů.

Allelic Ladder Mentype® DIPscreen: směs umělých produktů PCR reprezentujících všechny alely detekované testem, která se používá jako genotypizační reference pro přesnou identifikaci alel.

Skladování činidel a manipulace s nimi

Souprava je dodávána na suchém ledu. Složky soupravy by měly být dodány zmrazené, s výjimkou Multi Taq 2 DNA Polymerase, která je uložena v pufru zabraňujícím zmrazení činidla.

Po převzetí zkontrolujte úplnost soupravy. Nepoužívejte soupravy, které byly při doručení rozmrazeny. Pokud jedna nebo několik komponent není zmrazeno nebo pokud byly zkumavky nebo obal během přepravy poškozeny, nelze zaručit požadovanou funkční způsobilost.

Všechny komponenty skladujte při teplotě $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, chráněné před světlem. Zejména Mentype® DIPscreen Primer Mix Size Standard DNA 550 (BTO) a Allelic Ladder Mentype® DIPscreen je třeba skladovat chráněné před světlem.

Aby se předešlo kontaminaci, doporučujeme skladovat a používat komponenty předamplifikace (vzorky DNA, Control DNA XY82) a komponenty poamplifikace (Size Standard DNA 550 (BTO) a Mentype® DIPscreen Allelic Ladder) odděleně od PCR činidel(Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A a Mentype® DIPscreen Primer Mix).

Platnost soupravy končí podle údajů na štítku na krabici soupravy nebo 12 měsíců po otevření, podle toho, co nastane dříve. Nepřekračujte maximální počet 20 zmrazovacích a rozmrazovacích cyklů.

Požadovaný, ale neposkytnutý materiál a prostředky

Všeobecné laboratorní vybavení

- Stolní odstředivka s rotorem pro reakční zkumavky o objemu 2 mL a 200 μL
- Odstředivka s rotorem pro mikrotitrační destičky pro reakční destičky s 96 jamkami
- Vortexová míchačka

- Kalibrované nastavitelné pipety s likvidačními aerosolovými filtračními špičkami
- Vhodné reakční destičky 200 µL s 96 jamkami nebo reakční zkušavky o objemu 200 µL s odpovídajícím uzavíracím materiálem, PCR třída
- Vhodné stojany pro reakční zkušavky o objemu 2 mL a 200 µL
- Chladicí stojan vhodný pro 2 mL zkušavky
- Jednorázové nepudrové rukavice
- NanoDrop™ One Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) nebo fluorometr Qubit (Thermo Fisher Scientific)

POZNÁMKA

Všechny materiály použité pro PCR by měly mít odpovídající kvalitu (bez DNA a pro molekulární biologii). Ujistěte se, že všechny použité přístroje byly instalovány, kalibrovány, kontrolovány a udržovány podle pokynů a doporučení výrobce.

Činidla, soupravy a spotřební materiál

Tabulka 3 Požadovaná, ale neposkytnutá činidla

Činidlo	Dodavatel	Objednací číslo
Matrix Standard BT5 multi (25 µL)	BIOTYPE GmbH	45-15100-0025
Matrix Standard BT5 multi (2 × 25 µL)	BIOTYPE GmbH	45-15100-0050
ChimerisMonitor IVD	BIOTYPE GmbH	46-14800-0000
QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (IVD)	Qiagen	61104
NucleoSpin® DX Blood (IVD)	Macherey-Nagel	740899.50
Hi-Di™ Formamide, 25 mL	Thermo Fisher Scientific	4311320
POP-4™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 samples)	Thermo Fisher Scientific	4393715
POP-7™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 samples)	Thermo Fisher Scientific	4393708
Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series	Thermo Fisher Scientific	4393927

Činidlo	Dodavatel	Objednáací číslo
Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series	Thermo Fisher Scientific	4408256
3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 36 cm	Thermo Fisher Scientific	4404683
3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 50 cm	Thermo Fisher Scientific	4404685

Přístroje a software

Souprava Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit byla validována pro použití s následujícími PCR cykly:

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

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

Použití jiných než dříve uvedených nástrojů musí být validováno uživatelem. Musí být splněny následující specifikace:

- Vyhřívané víko
- Blok vhodný pro reakční desky / zkumavky o objemu 200 µL
- Rampování nastavitelné na 4 - 5 °C/s

Souprava Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit byla validována pro použití s následujícím přístrojem a nastaveními:

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

Souprava Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit byla validována pro použití s následujícími softwary. K analýze a hodnocení dat je zapotřebí

pouze jeden z níže uvedených softwarů. Ruční hodnocení souborů fsa nebo jakýchkoli výsledků poskytnutých pomocí softwaru pro sběr dat bez jedné ze dvou popsanych možností softwaru pro analýzu a hodnocení dat není validováno.

- ChimerisMonitor IVD, verze 3.0.x (BIOTYPE GmbH)
- Software GeneMapper™ ID-X, verze 1.6 (Thermo Fisher Scientific), s použitím specifického produktu:
 - Analysis Method: DIPscreenIVD_Analysis4_v1x nebo DIPscreenIVD_Analysis7_v1x
 - Bin: DIPscreenIVD_Bins4_v1x nebo DIPscreenIVD_Bins7_v1x
 - Panel: DIPscreenIVD_Panel4_v1x nebo DIPscreenIVD_Panel7_v1x
 - Size Standard: BTO_60-550_v1x

POZNÁMKA



Ujistěte se, že všechny použité přístroje byly instalovány, kalibrovány, kontrolovány a udržovány podle pokynů a doporučení výrobce.

Vzorky a zkušební vzorky

Následující vzorky byly validovány pomocí soupravy Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit:

- Genomová DNA izolovaná z lidské periferní žilní plné krve (EDTA, citrát, heparin) pro monitorování a genotypizaci.

Izolovaná gDNA se uchovává neředěná při teplotě -25 °C až -15 °C.

POZNÁMKA



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

Upozornění a bezpečnostní opatření

- Před použitím produktu si pečlivě přečtěte návod k použití.
- Přečtěte si bezpečnostní listy (SDS) a prohlášení o nebezpečnosti (NHS) všech produktů BIOTYPE, které jsou k dispozici na vyžádání nebo na naší domovské stránce (www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter). U produktů, které nevyžadují bezpečnostní list, protože neobsahují SVHC nebo podléhají jiným omezením podle nařízení 1272/2008 (CLP), poskytuje BIOTYPE bezpečnostní list na vyžádání.
- Obraťte se na výrobce požadovaných materiálů a činidel, které nejsou uvedeny, a vyžádejte si kopie bezpečnostních listů pro všechna dodatečně potřebná činidla.
- Komponenty soupravy z různých šarží soupravy se nesmí míchat.
- Alikvotování složek soupravy do jiných reakčních nádob není povoleno.
- Použití tohoto produktu je omezeno na odborné uživatele v laboratořích, kteří jsou vyškoleni v molekulárně-genetických technikách, multiplexní PCR a manipulaci s Genetic Analyzers společnosti Thermo Fisher Scientific.
- Před prvním použitím zkontrolujte, zda produkt a jeho komponenty:
 - Integrita
 - Úplnost z hlediska počtu, typu a náplně (viz kapitola Poskytnuté materiály)
 - Správné označování
 - Zmrazený stav při doručení (kromě Multi Taq 2 DNA Polymerase)
- Se vzorky by se mělo vždy zacházet jako s infekčními a/nebo biologicky nebezpečnými v souladu s bezpečnými laboratorními procedurami a správnou laboratorní praxí.
- Nepoužívejte soupravu s prošlou dobou použitelnosti.
- Vzorky a odpad z testování zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.
- Všechny použité přístroje byly instalovány, kalibrovány, kontrolovány a udržovány podle pokynů a doporučení výrobce.

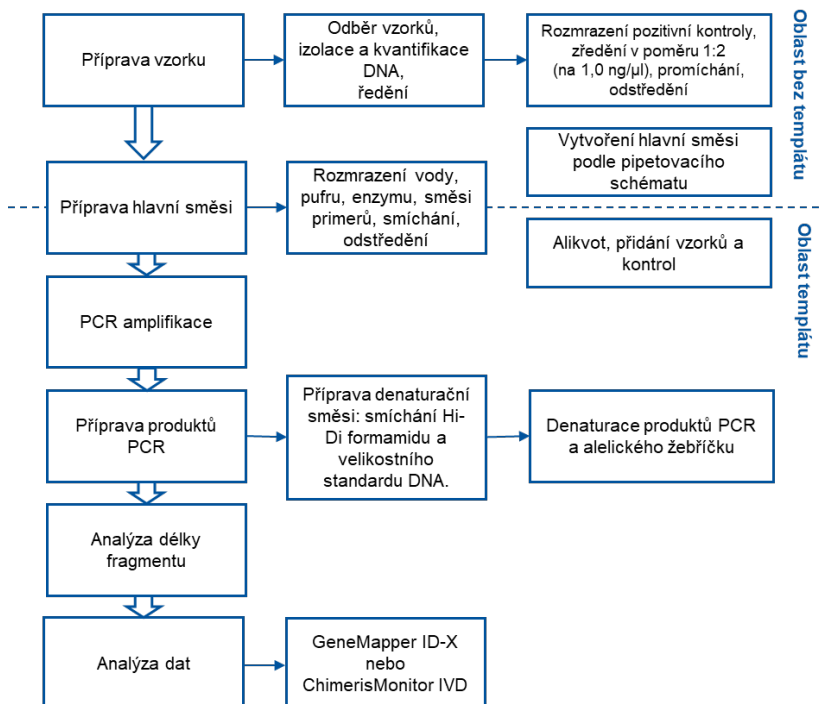
Upozornění pro uživatele

Jakýkoli problém, který se vyskytne v souvislosti s produktem, musí uživatel nahlásit výrobci. Jakékoli závažné události související s touto soupravou musí být hlášeny výrobci a příslušnému orgánu členského státu, ve kterém uživatel a/nebo pacient sídlí.

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

Procedura

Přehled experimentálního pracovního postupu



Příprava vzorku

Požadavky na surový vzorek

Odeberte alespoň 200 µL vzorku periferní žilní plné krve pro následující proceduru.

Manipulace se surovým vzorkem (periferní žilní plná krev) by se měla řídit doporučením pokynu MM05-A2 (2. vydání) Institutu pro klinické a laboratorní standardy (CLSI), který uvádí, že 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. Kromě toho se doporučuje, aby se při odběru plné krve používala antikoagulantia EDTA, citrát nebo heparin.

POZNÁMKA



Dlouhé skladování surového vzorku by mohlo vést k fragmentaci genetického materiálu, a tím k nedostatečné kvalitě materiálu. 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 funkční účinnosti produktu byly validovány následující soupravy:

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit
- Macherey-Nagel NucleoSpin® Dx Blood, CE certifikovaná minisouprava pro DNA z krve

POZNÁMKA



Kontaminaci krve lze vizuálně zjistit v reakci PCR nebo v izolované DNA podle oranžového barevného posunu. Pokud dojde ke změně barvy, doporučujeme izolaci DNA opakovat, aby se předešlo případným interferencím.

POZNÁMKA



Před elucí nukleové kyseliny se ujistěte, že jste odstranili veškeré stopy etanolu. Etanol je silným inhibitorem PCR.

Kvantifikace a ředění DNA

Kvantifikujte koncentraci DNA pomocí UV/VIS spektroskopie při 260 nm pomocí spektrofotometru NanoDrop nebo pomocí fluorescenční spektroskopie s použitím Qubit™ Fluorometer.

Při použití spektrofotometrie použijte k měření prázdného vzorku eluční pufr ze soupravy pro extrakci DNA. Poměr A_{260}/A_{280} by se měl pohybovat v rozmezí 1,7 - 1,9, zatímco poměr A_{260}/A_{230} by měl být v rozmezí 1,8 - 2,3.

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

Pro použití se soupravou Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit naředte vzorky DNA na optimální koncentraci 2,0 ng/μL. Ředění si připravte čerstvě před použitím. Jako ředidlo použijte Nuclease-Free Water.

POZNÁMKA

i

Celkový vstupní rozsah soupravy je 0,125 - 2,0 ng DNA na reakci, **optimální vstupní množství je 2 ng DNA** na reakci za standardních podmínek pro dosažení nejvyšší citlivosti. Vstup nižší než 0,125 ng by mohl vést k neúplným profilům, vyšší vstup by mohl vést ke pull-up píkům.

Skladování DNA

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

Příprava kontroly

Pozitivní kontrola PC

Rozmrzte Control DNA XY82, homogenizujte ji vířením a následným krátkým odstředěním.

Zředte Control DNA XY82 v poměru 1:2 z 2,0 ng/μL na 1,0 ng/μL pomocí Nuclease-Free Water.

Zředěný PC homogenizujte krátkým vířením. Poté naředěný PC krátce odstředte (přibližně 10 s). Zředěnou pozitivní kontrolu neskladujte.

POZNÁMKA



Vždy použijte čerstvé ředění Control DNA XY82.

Kontrola bez templátu NTC

Místo vzorku použijte Nuclease-Free Water, která je součástí soupravy, jako kontrola bez templátu (NTC).

Nastavení master mixu

Ze soupravy Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit pro nastavení master mixu vyjměte následující komponenty:

- Nuclease-Free Water (světle modrý uzávěr)
- Reaction Mix A (fialový uzávěr)
- Primer Mix Mentype® DIPscreen (červený uzávěr)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (bílý uzávěr)

Všechny zmrazené komponenty by se měly rozmrazit při pokojové teplotě (22 °C až 28 °C, přibližně 30 min, chráněné před světlem) a homogenizovat převrácením zkumavek nebo jemným vířením. Poté činidla krátce odstředte (přibližně 10 s). Pro dodržení zásad správné laboratorní praxe se doporučuje uchovávat Multi Taq 2 DNA Polymerase před nastavením master mixu co nejdéle v chlazeném prostředí (např. v chladicím stojanu).

POZNÁMKA

Pro delší stabilitu míchejte Multi Taq 2 DNA Polymerase poklepáváním – **enzym nemíchejte pomocí vortexu.**

Ve vyhrazeném čistém prostoru připravte PCR master mix podle Tabulka 4 do mikrocentrifugační zkumavky vhodné velikosti pro celkový počet testovaných vzorků. Do výpočtu zahrňte alespoň jednu PC a jedno NTC.

POZNÁMKA

Platí pravidlo, že pokud testujete méně než 10 vzorků, použijte dostatečné množství master mixu pro jeden vzorek navíc. Pokud testujete 10 nebo více vzorků, použijte přebytný objem hlavního mixu činidla +10 %.

Tabulka 4 Nastavení reakce PCR master mixu, * Objem závisí na koncentraci DNA. Pokud použijete větší objem templátu DNA, nezapomeňte upravit objem Nuclease-Free Water. Celkový objem reakce (rxn) musí být vždy 25,0 µL.

Komponenta	Objem		
	1 rxn	5 rxn	10 rxn
Nuclease-Free Water *	13,4 µL	67,5 µL	134,0 µL
Reaction Mix A	5,0 µL	25,0 µL	50,0 µL
Primer Mix Mentype® DIPscreen	5,0 µL	25,0 µL	50,0 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	0,6 µL	2,4 µL	6,0 µL
Templát DNA nebo kontrolní vzorek	1,0 µL*	5 × 1,0 µL*	10 × 1,0 µL*
Celkový objem	25,0 µL	125,0 µL	250,0 µL

Směs master mixu promíchejte jemným vířením a poté ji krátce odstředíte.

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

Použití templátů DNA a kontrol

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

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

Vzorek: přidejte 1,0 µL připravených naředěných vzorků gDNA (2,0 ng/µL).

PC: místo vzorku přidejte 1,0 µL připravené Control DNA XY82 naředěné v poměru 1:2 (1,0 ng/µL).

POZNÁMKA



Nejprve připravte NTC, aby nedošlo ke kontaminaci kontroly. 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 běh. V opačném případě nelze běh validovat.

Uzavřete všechny PCR zkumavky, jemně promíchejte a odstřed'te.

PCR amplifikace

Naprogramujte PCR cykler s následujícím amplifikačním profilem, nezapomeňte nastavit rampování na 4 - 5 °C/s. Proved'te „horký 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	28 cyklů
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	držet

POZNÁMKA



Pokud se používají termické cykly s nastavitelnými kroky ohřevu a chlazení, **musí být rampování nastaveno na 4 - 5 °C/s**, aby byla zajištěna optimální rovnováha signálu.

POZNÁMKA



Základní informace o nastavení, programování a údržbě různých PCR přístrojů naleznete v uživatelské příručce příslušného přístroje.

POZNÁMKA



Velmi malá množství DNA mohou mít za následek statistické výpadky a nevyváženost píků. Zvýšení počtu cyklů PCR zvyšuje riziko křížové kontaminace způsobené minimálním množstvím nečistot. Kromě toho se mohou objevit nespecifické amplifikační produkty.

Kapilární gelová elektroforéza

Příprava produktů PCR

Po dokončení PCR vyjměte vzorky z cykleru a krátce je odstřed'te.

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.

Činidla rozmrazte, promíchejte a odstřed'te:

- Hi-Di™ Formamide (není součástí soupravy)
- Mentype® DIPscreen Allelic Ladder (zelený uzávěr)

- DNA Size Standard BTO (550) (oranžovýd uzávěr)

Připravte denaturační směs popsanou v Tabulka 6 a přidejte jednu nebo dvě reakce, abyste vyrovnali odchylky v pipetování. Zahrňte další reakci pro alelický žebříček.

Tabulka 6 Denaturační směs

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

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

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

POZNÁMKA



Allelic Ladder se používá ke správnému určení analyzovaných fragmentů během analýzy dat. V každém běhu analýzy délky fragmentu musí být Allelic Ladder analyzován alespoň jednou, aby bylo zajištěno úspěšné hodnocení dat.

POZNÁMKA



Kapiláry prostředku pro gelovou elektroforézu by nikdy neměly vyschnout. Pokud vzorky neobsadí všechny pozice kapiláry, naplňte další jamky destičky 12,0 µL Hi-Di™ Formamide podle počtu kapilár.

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

Analýza délky fragmentu

Před provedením první analýzy délky fragmentu spusťte Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE GmbH), abyste provedli spektrální zarovnání použitých fluorescenčních barviv pro soupravu Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit (6-FAM™, BTG, BTY, BTO).

POZNÁMKA



Při instalaci se řiďte návody k použití Matrix Standard BT5 multi. Ty jsou k dispozici na adrese www.biotype.de/en/ifus nebo na vyžádání prostřednictvím support@biotype.de BIOTYPE GmbH.

Po úspěšném běhu Matrix Standard BT5 multi importujte dodaná nastavení přístroje pro 3500 Series Genetic Analyzer, jak je popsáno v Tabulka 7 (www.biotype.de/en/template-files).

Tabulka 7 Poskytnuté soubory pro Genetic Analyzers

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

3500 Series Genetic Analyzer	
Instrument Protocol	POP-4™, 36 cm capillary array: DIPscreenIVD_Instrument436.xml POP-7™, 50 cm capillary array: DIPscreenIVD_Instrument750.xml
Size Standard Protocol	BTO_60-550_SizeStandard.xml
Sizecalling Protocol	BTO_60-550_Sizecalling.xml
Test	POP-4™, 36 cm capillary array: DIPscreenIVD_Assay436.xml POP-7™, 50 cm capillary array: DIPscreenIVD_Assay750.xml

Specifikace požadovaného protokolu přístroje jsou popsány v Tabulka 8. Měly by se upravovat pouze popsané parametry, ostatní parametry by měly

zůstat ve výchozím nastavení. Při nastavování specifických provozních parametrů postupujte podle návodu k použití od výrobce.

Tabulka 8 Parametry běhových modulů různých prostředků pro kapilární gelovou elektroforézu

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

Odchylně od hodnot uvedených v Tabulka 8 lze dobu běhu upravit podle délky použitého kapilárního Array, ale je nutné analyzovat všechny fragmenty (60 - 550 bp) DNA Size Standard 550 (BTO).

Pro nastavení Size Standard Protocol musí být oranžovému panelu přiřazeny následující velikosti 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.

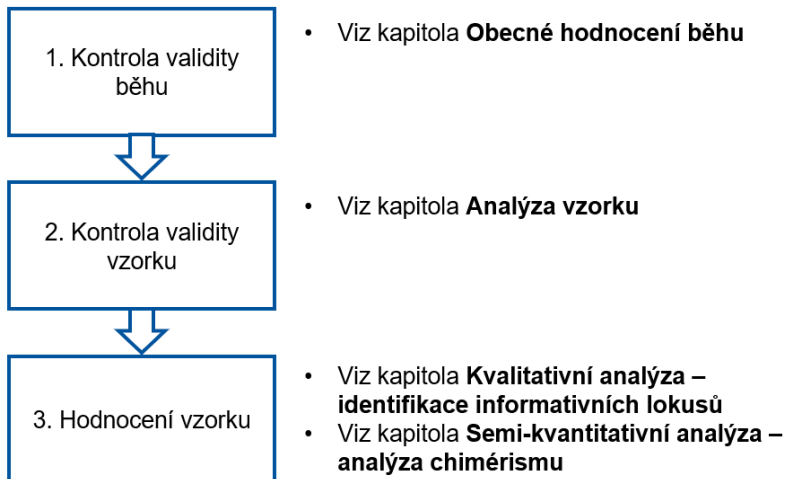
POZNÁMKA

i

Společnost BIOTYPE GmbH poskytuje specifické šablony pro snadnou instalaci specifických nastavení běhu pro analýzu délky fragmentu a také analytické šablony pro jednoduché nastavení softwaru GeneMapper™ ID-X. Tyto šablony jsou k dispozici ke stažení prostřednictvím: www.biotype.de/en/template-files.

Analýza dat

Obecná procedura analýzy dat



POZNÁMKA

i

Analýza dat musí být provedena buď pomocí softwaru ChimerisMonitor IVD, nebo softwaru GeneMapper™ ID-X (Thermo Fisher Scientific). Ruční hodnocení souborů fsa nebo jakýchkoli výsledků poskytnutých pomocí softwaru pro sběr dat bez jedné ze dvou popsanych možností softwaru pro analýzu a hodnocení dat není validováno.

Validace běhu pracovního postupu



POZNÁMKA



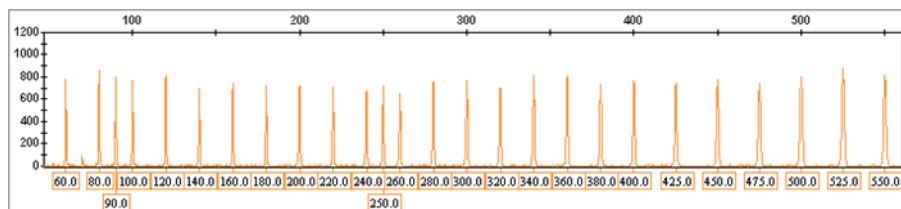
Pro posouzení validity je třeba analyzovat rozsah měření 50 - 560 bp.

DNA Size Standard 550 (BTO)

Zjištění přesné délky amplifikovaných produktů závisí na typu prostředí, podmínkách elektroforézy, a také na použitém velikostním standardu DNA. Vzhledem ke složitosti některých lokusů by se určení velikosti mělo zakládat na rovnoměrně rozložených referencích.

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

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



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

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder

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

POZNÁMKA



Mentype® DIPscreen Allelic Ladder obsahuje fragmenty pro každou detekovatelnou alelu. Porovnejte prosím alely s přílohou Tabulka 20 a Obrázek 5.

Control DNA XY82 (PC)

Po zajištění validního velikostního standardu se ujistěte, že je přítomen kompletní profil DNA všech specifických píků pro PC s výškou píku ≥ 200 RFU (viz Tabulka 9). Control DNA XY82 je kvalitativní kontrola PCR, která obecně zajišťuje funkční účinnosti master mixu.

Control DNA XY82 (viz příloha Obrázek 6), která je součástí testovací soupravy, představuje následující alely:

Tabulka 9 Genotyp Control DNA XY82, – = delece, + = inzerce

Lokus	Control DNA XY82	Lokus	Control DNA XY82
FAM Panel (modrý kanál)		BTG Panel (zelený kanál)	
Amelogenin	X/Y	HLD91	+/+
HLD106	+/+	HLD23	-/+
HLD70	-/+	HLD88	+/+
HLD84	+/+	HLD101	-/+
HLD103	-/+	HLD67	-/+
HLD104	-/+	HLD301	-/+
HLD116	-/+	HLD53	+/+
HLD112	-/+	HLD97	-/+
HLD307	+/+	HLD152	-/+
HLD310	-/+	HLD128	-/+
HLD110	-/+	HLD134	+/+
HLD133	-/+	HLD305	+/+
HLD79	+/+	BTY Panel (žlutý kanál)	
HLD105	-/-	HLD48	-/-
HLD140	-/+	HLD114	-/-
HLD163	-/+	HLD304	-/+
		HLD131	+/+
		HLD38	+/+
		HLD82	+/+

Kontrola bez templátu NTC

Po zajištění validního velikostního standardu zkontrolujte, zda v rozsahu Bin NTC nejsou detekovány žádné píky nad mezní hodnotou **≥ 200 RFU** (viz příloha Obrázek 6).

POZNÁMKA



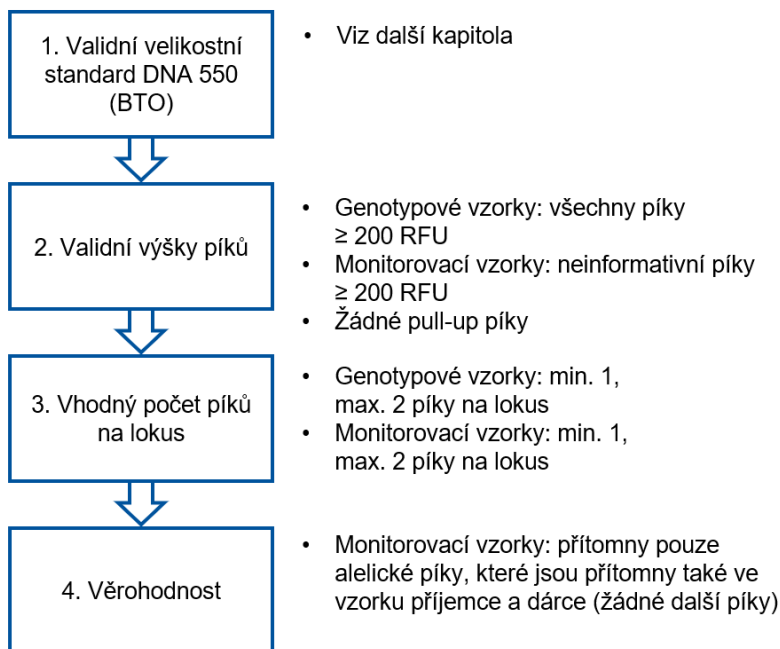
Při použití softwaru ChimerisMonitor IVD nebo GeneMapper™ ID-X spolu s dodanými templátovými soubory pro Analysis Method nejsou píky < 200 RFU automaticky přiřazeny k názvu alely, což vám pomůže snadno hodnotit výsledky.

POZNÁMKA

V NTC se mohou výrazněji vyskytovat artefakty, jako jsou malé skvrny barvy. Vzhledem k široké základně píku, abnormálnímu tvaru píku a absenci přiřazení píku je možné odlišení od amplikonových píků.

Analýza vzorku

Analýza dat pracovního postupu



Pomocí softwaru ChimerisMonitor IVD jsou popsány validační kroky pro běh a vzorky prováděny automaticky.

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

Kvalitativní analýza – identifikace informativních lokusů

V následující části je vysvětlena identifikace a rozlišení lokusů specifických pro příjemce. Proto jsou lokusy specifické pro dárce definovány jako neinformativní. Identifikace informativních lokusů se provádí na základě údajů příjemce a dárce před transplantací. Příklady viz [Tabulka 21](#) – [Tabulka 22](#) v příloze.

Pomocí softwaru ChimerisMonitor IVD je podporována identifikace informativních lokusů.

Informativní lokusy: Jednu alelu ve vzorku příjemce nelze zjistit ve vzorku dárce.

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

Semikvantitativní analýza – analýza chimérismu

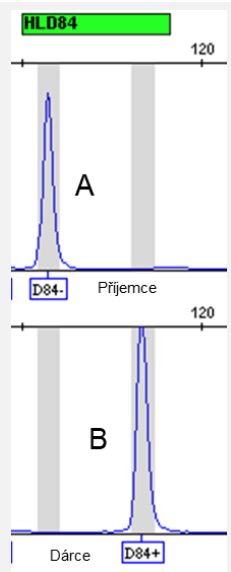
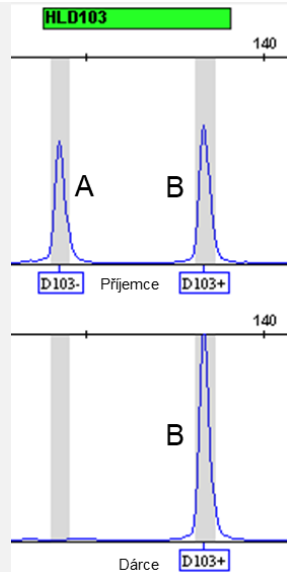
Semikvantitativní analýza chimérismu se provádí podle popisu v literatuře, např. Clark et al. (2015) [1] nebo Nollet et al. (2001) [2]. Vzorce pro kvantifikaci závisí na alelické konstelaci v lokusu a jsou uvedeny v následující [Tabulka 10](#) (upraveno podle Clark et al.). Hodnota chimérismu se vypočítá pro každý dříve vybraný informativní lokus. Poté se vypočítá průměr všech hodnot chimérismu specifických pro daný lokus.

POZNÁMKA



Pro identifikaci odlehklých hodnot se doporučuje hodnotit každý SD_{Marker} . SD_{Marker} pro vzorky s nízkým smíšeným chimérismem (<5 % MC) by neměl překročit 4 %. U středního až vysokého smíšeného chimérismu (> 5 % MC) by SD_{Marker} neměl překročit 10 %. Pokud SD_{Marker} překročí limity, doporučuje se znovu analyzovat hodnoty MC vybraných markerů kvůli odlehklým hodnotám.

Tabulka 10 Semikvantitativní analýza chimérismu (upraveno podle Clark et al. [1])

Scénář 1	Scénář 2
žádné sdílené alely: příjemce je homozygotní, dárce je homozygotní, nejsou sdílené žádné píky 	jedna sdílená alela (homozygotní): příjemce je heterozygotní, dárce je homozygotní, jeden pík je sdílený 
Poměr příjemce: $\% \text{ chimérismus} = \frac{A}{A+B} \times 100\%$	Poměr příjemce: $\% \text{ chimérismus} = \frac{A}{\left(\frac{B-A}{2}\right) + A} \times 100\%$

Analýza dat pomocí softwaru ChimerisMonitor IVD

ChimerisMonitor IVD je pokročilý software pro automatizovanou analýzu dat, hodnocení běhu a výpočet chimérismu. Integrovaný systém **Patient Management** umožňuje monitorovat kinetiku chimérismu v přehledech s vysokým rozlišením, ale také v grafech a tabulkové vizualizaci.

Obecné pokyny k analýze vzorků naleznete v návodu k použití softwaru ChimerisMonitor IVD.

Všechny požadované templáty pro analýzu jsou obsaženy v dokumentu **Test Kit Management** systému ChimerisMonitor. Ty obsahují metody analýzy a propojené templáty Bin a panelu. Software provádí během dávkového importu obecné integrované hodnocení běhu podle kapitoly **Validace běhu pracovního postupu**. Obecný popis pracovního postupu analýzy dat v nástroji naleznete v Tabulka 11.

POZNÁMKA

i

Analýza dat musí být provedena buď pomocí softwaru ChimerisMonitor IVD, nebo softwaru GeneMapper™ ID-X (Thermo Fisher Scientific). Ruční hodnocení souborů fsa nebo jakýchkoli výsledků poskytnutých pomocí softwaru pro sběr dat bez jedné ze dvou popsanych možností softwaru pro analýzu a hodnocení dat není validováno.

Tabulka 11 Pracovní postup analýzy chimérismu s nástrojem ChimerisMonitor

Č.	Ikona	Pracovní krok
1		Import vzorku
		Create new patient. Databáze všech vytvořených pacientů je uvedena ve Správě pacientů Batch Import: - Vyberte testovací soupravu Biotype Mentype DIPscreen
		Všechny prahové hodnoty pro správný běh a hodnocení vzorku jsou propojeny s příslušnou metodou analýzy. - Importujte běh obsahující soubory fsa alelického žebříčku, pozitivní kontrolu, kontrolu bez templátu a vzorky.

Č.	Ikona	Pracovní krok
		- Typy vzorků vyberte ručně (nezbytné pro správné přiřazení píků a výpočet chimérismu) - Obecné hodnocení běhu a vzorku provádí software Otevřete Batch Import View Assign Sample: Vyberte vzorek a přiřaďte jej k pacientovi
2		Kontrola ovládacích prvků – ChimerisMonitor provádí integrované hodnocení kvality a hodnocení běhu a vzorku Kontrola Allelic Ladder Electropherogram a Size Calling Regression Zobrazí se případná varování o kvalitě: - V záložce Evaluation of Allelic Ladders během dávkového importu - V záložce Evaluation of Allelic Ladders v editoru pacienta Kontrola Positive Control Electropherogram a Size Calling Regression Na stránkách Evaluation of Positive and No Template Controls během dávkového importu zobrazuje případná varování o kvalitě. Kontrola No Template Control Electropherogram a Size Calling Regression Na stránkách Evaluation of Positive and No Template Controls během dávkového importu zobrazuje případná varování o kvalitě.
3		Kontrola Sample Electropherogram Správné přiřazení píků je nezbytné pro přesnou definici informativních markerů a spolehlivý výpočet chimérismu. Kontrola Sample Quality zobrazuje během dávkového importu možná varování o kvalitě Zkontrolujte velikost vzorku Volání regrese Kontrola Sample Quality zobrazuje během dávkového importu možná varování o kvalitě
4		Definice informativních markerů. Create a new transplantation: pro monitorování pacienta lze zvolit předdefinované markery
5		Calculate Chimerism: Podívejte se na předem vybrané markery pro analýzu chimérismu a proveďte výpočet chimérismu

Č.	Ikona	Pracovní krok
		(chimérismus jednotlivých markerů, celkový chimérismus a směrodatná odchylka)
6	Zpráva	
		Create Report: Jednotlivé hodnoty a kinetika chimérismu se zobrazují v čase (tabulka a graf, formát souboru pdf nebo csv)
7		Vytvoření databázově řízeného systému pro Patient Management

Analýza dat pomocí softwaru GeneMapper™ ID-X

Příprava softwaru GeneMapper™ ID-X

Obecné pokyny k použití a analýze vzorků pomocí tohoto softwaru naleznete v uživatelské příručce k softwaru GeneMapper™ ID-X.

Rozdělení alel se provádí pomocí analytického softwaru GeneMapper™ ID-X v kombinaci s templátovými soubory Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit od BIOTYPE GmbH. Templátové soubory BIOTYPE (viz Tabulka 12) jsou k dispozici na naší domovské stránce (<https://www.biotype.de/en/template-files>) ke stažení nebo na vyžádání prostřednictvím support@biotype.de. Pracovní postup analýzy chimérismu pomocí softwaru GeneMapper™ ID-X je uveden v Tabulka 13.

Tabulka 12 BIOTYPE GmbH templáty pro software GeneMapper™ ID-X,
templáty specifické pro #POP-4™ nebo §POP-7™

Templát	Název templátu
Panels*	DIPscreenIVD_Panel4_v1x [#] nebo vyšší verze DIPscreenIVD_Panel7_v1x [§]
Bin Sets*	DIPscreenIVD_Bins4_v1x [#] nebo vyšší verze DIPscreenIVD_Bins7_v1x [§]
Size Standard *	BTO_60-550_v1x nebo vyšší verze
Analysis Method*	DIPscreenIVD_Analysis4_v1x [#] nebo vyšší verze DIPscreenIVD_Analysis7_v1x [§]
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes
Table Settings	Table for 2 Alleles Table for 10 Alleles

*Tyto templáty musí být vždy použity pro analýzu dat. Ostatní templátové soubory jsou volitelné.

POZNÁMKA

i

Import a volání alel s poskytnutými templátovými soubory je zaručeno pouze v případě použití softwaru GeneMapper™ ID-X. Při použití softwaru GeneMapper™ se mohou vyskytnout problémy s importem některých templátových souborů. Je možné, že budete muset upravit panely a Bins s jedním nebo více běhy Allelic Ladder na specifickém nastavení přístroje. Kontaktujte nás pro podporu (support@biotype.de).

Tabulka 13 Pracovní postup analýzy chimérismu se softwarem GeneMapper™ ID-X

Č.	Ikona	Pracovní krok										
1		Příprava softwaru										
		Panel Manager Importovat poskytnuté templátové soubory šablon pro Panel, Bins										
		GeneMapper™ ID-X Manager Importovat poskytnutý templát pro Analysis Method a Size Standard										
2		Import vzorku										
		Add Samples to Project - vyhledejte složku běh, vyberte a Add to List → Add										
3		Analýza vzorku										
		Vyberte následující vlastnosti v příslušných sloupcích vzorkového listu a zvolte možnost Analyze .										
		<table><tr><th>Název sloupce</th><th>Vybrat</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 Templát BIOTYPE GmbH DIPscreenIVD_Analysis_v1x</td></tr><tr><td>Panel</td><td>Vyberte dříve importované Templát BIOTYPE GmbH DIPscreenIVD_Panel_v1x</td></tr><tr><td>Size Standard</td><td>Vyberte dříve importované Templát BIOTYPE GmbH BTO_60-550_v1x</td></tr></table>	Název sloupce	Vybrat	Sample Type	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control nebo Sample	Analysis Method	Vyberte dříve importované Templát BIOTYPE GmbH DIPscreenIVD_Analysis_v1x	Panel	Vyberte dříve importované Templát BIOTYPE GmbH DIPscreenIVD_Panel_v1x	Size Standard	Vyberte dříve importované Templát BIOTYPE GmbH BTO_60-550_v1x
Název sloupce	Vybrat											
Sample Type	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control nebo Sample											
Analysis Method	Vyberte dříve importované Templát BIOTYPE GmbH DIPscreenIVD_Analysis_v1x											
Panel	Vyberte dříve importované Templát BIOTYPE GmbH DIPscreenIVD_Panel_v1x											
Size Standard	Vyberte dříve importované Templát BIOTYPE GmbH BTO_60-550_v1x											
4		Kontrola ovládacích prvků										

Č.	Ikona	Pracovní krok
		Ověření validity kontroly (Allelic Ladder, Positive Control, No Template Contro)
		Při dostatečných výškách píku se přiřazení provádí podle specifikací uvedených v Analysis Method
5		Hodnocení vzorku
		Kontrola validity vzorku.
		Při dostatečných výškách píku se přiřazení provádí podle specifikací uvedených v Analysis Method
		Pokud nejsou píky přiřazeny, přestože je dosaženo dostatečných výšek, je možné provést ruční přiřazení. Zkontrolujte přiřazení všech píků z hlediska věrohodnosti.
6		Definice informativních markerů.
		Porovnejte genotypy příjemce a dárce a poté ručně identifikujte informativní markery (viz příloha, <u>Příklady kvalitativního hodnocení lokusů</u>)
7		Analýza chimérismu
		Exportujte Sizing Table a vypočítejte hodnoty chimérismu podle <u>Tabulka 10</u> – viz kapitola <u>Semikvantitativní analýza – analýza chimérismu</u>

POZNÁMKA

i

Pomocí dodaných templátových souborů pro Analysis Method, Bins a Panels a výběrem odpovídajícího typu vzorku software automaticky zkontroluje validitu těchto vzorků. Příznaky kontroly kvality SOS (Sample off-Scale), SQ (Sizing Quality), OMR (Outside Marker Range) musí být v zelených rámečcích, pokud je validita vyhovující.

ARNM	SOS	SQ	SSPK	MIX	OMR	CGQ
						

POZNÁMKA

K hodnocení velikostního standardu použijte Size Match Editor v softwaru GeneMapper™ ID-X. Pokud automatické vyvolání fragmentu selže, lze pro orientaci při ručním přiřazování píků použít triplety 80 / 90 / 100 bp a 240 / 250 / 260 bp.

Řešení problémů

Analýza post-PCR a automatické přiřazení alel pomocí vhodného analytického softwaru zajišťuje přesné a spolehlivé rozlišení alel.

Automatický výpočet poměru dárcovské/přijímající DNA, stejně jako standardní odchylky a detekční limity, lze získat přímo ze surových dat analýzy velikosti fragmentů.

Pokud mají být výsledky získané pomocí soupravy Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit harmonizovány s výsledky cytologických analýz, ujistěte se, že cytologické analýzy byly 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 aplikována nesprávná matrice. Mohou se objevit na místech specifických píků v jiných barevných panelech, obvykle s nižší intenzitou signálu. Při pravidelném pozorování zvažte opakování generování matrice a zkontrolujte, zda nedošlo k přetížení DNA.

Přidávání nukleotidů nezávisle na templátu

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

Artefakty

Pokojová teplota může ovlivnit funkční účinnost produktů PCR na vícekapilárních přístrojích a mohou se objevit sekundární píky nebo rozdělené píky. Kromě toho by v některých případech mohlo být ovlivněno automatické přiřazení. Pokud se tyto účinky objeví, doporučujeme vzorek znovu vstříknout při vyšší pokojové teplotě a případně použít více než jeden vzorek Allelic Ladder na jeden běh.

Ve vzorcích se mohou vyskytovat i artefakty, jako jsou malé skvrny barviva, a to ještě výrazněji v NTC. Vzhledem k široké základně píku, abnormálnímu tvaru píku a absenci přiřazení píku je možné odlišení od amplikonových píků.

Odchytky při pipetování

Analýza robustnosti soupravy Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit ukázala, že souprava je robustní vůči drobným odchylkám od popsaného protokolu (odchylka $\pm 10\%$). Střední odchylka ($\pm 20\%$) od popsaného experimentálního protokolu může být kritičtější pro analýzu smíšeného chimérismu (zejména při nízkém procentu chimérismu). Zvláštní pozornost je třeba věnovat Reaction Mix A PCR pufru. Odchylka -20% v tomto pufru může mít za následek výrazné snížení výšky signálu nebo dokonce nedetekovatelnost markerů. Pro minimalizaci případných odchylek doporučujeme používat kalibrované pipety, přesné pipetování a důkladné míchání.

Odlehlé hodnoty

K identifikaci odlehlých hodnot se doporučuje hodnocení směrodatné odchylky v rámci markerů (SD_{Marker}). Pokud SD_{Marker} u vzorků s nízkým smíšeným chimérismem ($< 5\% \text{ MC}$) přesáhne 4% a u vzorků se středním až vysokým smíšeným chimérismem ($> 5\% \text{ MC}$) 10% , zvažte opětovnou analýzu hodnot MC bez této specifické odlehlé hodnoty.

Vliv polymerů

Souprava Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit byla validována a certifikována pro analýzu na polymeru POP-4™ a POP-7™.

Při použití polymeru POP-7™ se mohou v přední části elektroferogramů objevit skvrny barviva. Zejména v modrém kanálu byly pozorovány skvrny barviva o velikosti až 110 bp, které by mohly ovlivňovat lokus HLD106. Před

provedením analýzy chimérismu zkontrolujte elektroferogramy, zda se na nich takové účinky neprojevují.

Použití jiných polymerů (např. POP-6™) může ovlivnit běhové chování specifických produktů PCR. Kromě toho může dojít ke zvýšení šumu pozadí v důsledku odlišného chování volných fluorescenčních barviv.

Hodnocení funkční účinnosti

Analytická specifita

Pomocí softwaru Genemapper™ ID-X jsme testovali automatické přiřazování alel pomocí alelického žebříku a shodu přiřazení alel ve srovnání s předtypováním testované DNA pomocí jiných metod (jiné PCR soupravy).

Hodnotili jsme osmdesát jedna předem charakterizovaných vzorků DNA analyzovaných pomocí soupravy Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Byly detekovány kompletní profily s výškami píku ≥ 200 RFU. Po určení nastavení prostředku specifického pro test byl všem vzorkům DNA přiřazen správný genotyp pro všechny systémy DIP a marker amelogenin. Dále jsme hodnotili specifitu primerů soupravy Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Nebyly pozorovány žádné nespecifické chybné produkty PCR, čímž byla zajištěna specifita primerů soupravy Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit.

Interferenty a zkřížené reakce

Potenciální rušivé vlivy, které by mohly ovlivnit výsledky procedury měření, byly hodnoceny v souladu s doporučeními pokynů CLSI EP07 (3. vydání), EP37 (1. vydání). Pro soupravu Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit byly stanoveny endogenní a exogenní interferenty, byla testována jejich maximální očekávaná koncentrace ($C_{\max}$) v reakci PCR podle pokynů a v případě, že byla pozorována interference, byly testovány další koncentrace, aby se určila koncentrace, při které není interference detekovatelná.

Výsledky ukázaly rušivý účinek endogenního interferentu z krve testovaného na $2,57 \times 10^{-3}$ % v/v v reakci PCR na měření úplného profilu jednogentypové DNA. Dále byly pozorovány odchylky od neošetřené skupiny u vzorků se

smíšeným chimérismem měřených při 2 %, 5 % a 30 % MC. Výsledky byly mimo meze přesnosti, a vykazovaly tak interferenci s reakcí PCR. Kontaminaci krví však lze vizuálně zjistit v reakci PCR nebo v izolované suspenzi DNA podle oranžového barevného posunu. Vyškolení odborní uživatelé v laboratoři by měli sledovat, zda nedochází ke změně barvy, a izolaci DNA opakovat, aby se předešlo jakýmkoli interferencím.

U exogenních interferentů EDTA, citrátu sodného, etanolu, kyseliny acetylsalicylové, metoklopramidu a cyklosporinu se neprojevil žádný interferenční účinek při jejich příslušných C_{max} , kdy bylo možné dosáhnout měření celého profilu jednogentypové DNA XY1726, a odchylky od neošetřené skupiny pozorované u vzorků smíšeného chimérismu měřené při 2 %, 5 % a 30 % MC byly v mezích přesnosti.

U exogenních interferentů heparinu, proteinázy K a methotrexátu byla pozorována interference při C_{max} doporučené CLSI EP37 (1. vydání). Další ředění byla testována tak dlouho, dokud nebyla zjištěna žádná interference. Pro heparin 2,36E-02 mg/dL, pro proteinázu K 3,22E-06 % v/v a pro methotrexát 13,6 mg/dL nebyly zjištěny žádné interference.

Krevní antikoagulancia EDTA, citrát sodný a heparin byly dodatečně testovány pomocí doporučených izolačních souprav. Nebyl zjištěn žádný vliv na analytickou funkční účinnost. Očekáváme, že pracovní postup izolačních souprav vyloučí testované rušivé látky pocházející z antikoagulancií a činidel pro izolaci DNA. Pokud jde o chemoterapeutickou látku methotrexát, ta při testované koncentraci nevykazovala ve srovnání s referenčním prázdným vzorkem žádnou interferenci.

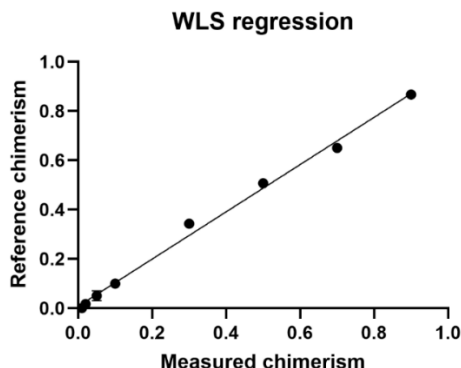
Tabulka 14 testované koncentrace endogenních a exogenních interferentů.

Typ interferentu	Kategorie	Interferent	Nerušivá koncentrace
Endogenní	Komponenty plné krve	Plná krev	není testováno
Exogenní	Antikoagulancia	EDTA	0,099 mg/dL
		Sodík, citrát	8.23E- 05 % v/v v PCR
		Heparin	2.36E- 02 mg/dL
	Izolační činidla DNA	Proteináza K	3.22E- 06 % v/v v reakci PCR
		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	13,6 mg/dL
	Imunosupresivní činidlo	Cyklosporin	0,18 mg/dL

Analytická citlivost

Lidská jednogenotypová gDNA je měřitelná v rozmezí 0,125 ng až 2,00 ng. V tomto rozsahu lze měřit úplné profily všech markerů DIP a amelogeninu bez závad. Jako optimální vstupní množství jednogenotypové DNA doporučujeme 1,00 ng pro přijatelnou analýzu celého profilu při současném snížení spotřeby materiálu. Pro detekci smíšeného chimérismu s optimální citlivostí jsme testovali různá vstupní množství. Abychom se vyhnuli omezené citlivosti při nízkých vstupních množstvích, definovali jsme 2,00 ng DNA jako optimální vstupní množství pro detekci smíšeného chimérismu. Linearita byla hodnocena na základě pokynu CLSI - EP06Ed2 (2. vydání). Linearita byla testována pomocí šesti různých vzorků smíšeného chimérismu. Každý vzorek smíšeného chimérismu 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 na 4 % pro vzorky do 10 % chimérismu příjemce, aby byly v tomto rozsahu

povoleny pouze malé odchylky. Pro chimérismus příjemce > 10 % byla ADL nastavena na 10 %, aby se umožnily střední 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 regrese různých koncentrací chimérismu pro směs chimérismu 82+1180. Regrese ukázala koeficient determinace 0,994, což potvrzuje vysoký stupeň linearity mezi naměřenými a očekávanými hodnotami v celém rozsahu testu od 1 % do 90 % chimérismu příjemce.

Limit prázdného vzorku (LoB) byl testován na 31 jednogentypových DNA ve třech různých dnech se dvěma různými šaržemi soupravy. LoB pro smíšený chimérismus byl vypočten pomocí neparametrického přístupu CLSI - EP17-A2 ($\alpha = 0,05$, 2. vydání). Analyzovány byly pouze informativní markery. Výsledek potvrdil LOB ve výši 0,49 %. Při použití vstupního množství 2,00 ng DNA jsme testovali tři různé vzorky smíšeného chimérismu o koncentracích 0,50 % až 3,00 %. Všechny vzorky byly testovány dvěma různými šaržemi soupravy. Při použití analýzy Probit (CLSI - EP17-A2, 2. vydání) s úrovní spolehlivosti 95 % byla výsledná mez detekce (LoD) pro šarži 1 1,36 % a pro šarži 3 1,39 %. Výsledná hlášená LoD je 1,39 % smíšeného chimérismu.

Tabulka 15 LoD pro soupravu Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit s použitím informativních markerů

Šarže	LoD (% smíšeného chimérismu)	N _{celkem}
Šarže 1	1,36 %	252
Šarže 3	1,39 %	252

Cíl přesnosti pro mez kvantifikace byl definován podle CLSI - EP17-A2 (2. vydání). Pro detekci chimérismu na LoD jsme definovali cíl přesnosti pomocí Westgardova modelu ($TE = |bias| + 1,96 s$; (Westgard et al. 1974 [3])) a zkreslení a přesnost testu. Výsledná souhrnná směrodatná odchylka 0,45 % byla nižší než cílová hodnota přesnosti založená na TE 1,77 %, což potvrzuje přijatelnou přesnost na úrovni LoD.

Přesnost

Nepřesnost a zkreslení se mohou lišit mezi různými obsahy chimérismu. Došli jsme k závěru rozdělit rozsah smíšeného chimérismu (MC) do tří intervalů, které rovněž uvádí Pettersson et al. (2021) [4] pro stanovení upravených kritérií přijatelnosti pro každý interval. Intervaly jsou následující:

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

Analýza přesnosti vycházela z pokynu CLSI - EP21-Ed2E (2. vydání). Zkreslení naměřené při porovnání s referenčním materiálem a nepřesnost (reprodukovatelnost) naměřená ve studii s více pracovišti byla použita k výpočtu hodnoty sigma na základě metriky Sigma (Westgard et al. 2018 [3]). Total Error acceptable byla stanovena na základě odhadů zkreslení ze studie linearity a uváděné nepřesnosti pro testy PCR založené na STR pro analýzu chimérismu (Pettersson et al. 2021 [4]). Výsledné hodnoty sigma vykazovaly dobrou přesnost pro nízký a střední interval MC a vynikající přesnost pro vysoký interval MC.

Tabulka 16 Sigma values pro smíšený chimérismus

Vzorek	Sigma value
2 % smíšený chimérismus	3,08
5 % smíšený chimérismus	3,05
30 % smíšený chimérismus	4,99

Pravost

Hodnocení zkreslení bylo založeno na referenčním materiálu od tří různých poskytovatelů kruhových testů (3 různé programy External Quality Control). Zkreslení bylo vypočteno pro rozdíl mezi výsledkem soupravy Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a referenční hodnotou:

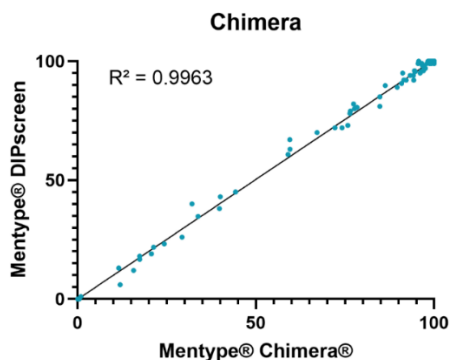
$$\Delta MC = \text{Referenční MC} - \text{Mentype DIPscreen MC}$$

Výpočet zkreslení vychází z pokynu 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, jak je popsáno výše (kapitola **Přesnost**). Výsledné zkreslení se pohybovalo od -0,68 do 0,74.

Tabulka 17 Zkreslení (průměr ΔMC) pro nízký, střední a vysoký MC

	nízký MC (< 5 %)	střední MC (5 - 20 %)	vysoký MC (> 20 %)
Zkreslení (průměr ΔMC)	0,54	0,74	-0,68

Kromě hodnocení zkreslení jsme porovnali soupravu Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit s referenční metodou. Referenční metoda založená na PCR Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit analyzuje polymorfismus krátkých tandemových repetitiv (STR) za účelem rozlišení dvou jedinců (genotypů). Obě metody byly měřeny u 97 vzorků pacientů s různým obsahem smíšeného chimérismu. Výsledný koeficient determinace 0,9963 potvrdil vysokou korelaci mezi oběma metodami.



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

Lineární regrese vpravo ukazuje přijatelnou korelaci s koeficientem determinace 0,9963.

Přesnost

Opakovatelnost a reprodukovatelnost testu jsme hodnotili na základě normy ISO 5725-2:2022-05 a CLSI - EP05 (3. vydání). Vzorky smíšeného chimérismu pokrývající rozsah měření chimérismu (2 %, 5 %, 30 %, 70 %) byly hodnoceny ve studii 5 × 5 × 3 (den × opakování × místo) na více místech. Výsledná opakovatelnost pro smíšený chimérismus se pohybovala mezi 0,60 % a 1,68 % směrodatné odchylky (SD) smíšeného chimérismu a reprodukovatelnost mezi 0,63 % a 1,75 % SD smíšeného chimérismu.

Mezní hodnota testu

Hodnotili jsme mezní hodnotu testu pro soupravu Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit na základě výpočtu alelické frekvence různých amplifikovaných markerů. Vzorky 81 jedinců byly analyzovány pomocí soupravy Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Výsledné alelické frekvence byly použity k výpočtu specifických forenzních diskriminačních parametrů, které jsou důležité i pro analýzu chimérismu, jako je informační obsah polymorfismu (PIC), očekávaná heterozygotita (HET) a síla diskriminace (PD), která demonstruje schopnost genetického markeru nebo souboru markerů rozlišovat mezi různými jedinci v populaci. Hodnoty PIC a HET ukazují vysoce polymorfní INDELy a vysokou míru heterozygotity pro

soupravu Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. PD pro všechna rozmezí markerů DIP se pohybuje od 0,5146 do 0,6581, což technicky umožňuje rozlišit dva jedince na základě alespoň jednoho markeru, ale PD se zvyšuje při použití více markerů v kombinaci.

Tabulka 18 Diskriminační pravděpodobnost všech markerů zahrnutých v soupravě Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. PIC, PD a HET byly vypočteny pro každý marker na základě analýzy 81 jedinců.

Marker	PIC	HET	PD
AM	0,3384	0,4341	0,4664
HLD106	0,3066	0,3804	0,5301
HLD70	0,3744	0,5019	0,6572
HLD84	0,3695	0,4921	0,6328
HLD103	0,3703	0,4938	0,6389
HLD104	0,3651	0,4835	0,6389
HLD116	0,3736	0,5003	0,5322
HLD112	0,3725	0,4982	0,5877
HLD307	0,3736	0,5003	0,6054
HLD310	0,3559	0,4660	0,6152
HLD110	0,3685	0,4901	0,6261
HLD133	0,3703	0,4938	0,6462
HLD79	0,3174	0,3981	0,5603
HLD105	0,3736	0,5003	0,6191
HLD140	0,3623	0,4783	0,5972
HLD163	0,3703	0,4938	0,6060
HLD91	0,3712	0,4954	0,5274
HLD23	0,3559	0,4660	0,5850
HLD88	0,3719	0,4969	0,5597
HLD101	0,3740	0,5012	0,6261
HLD67	0,3384	0,4341	0,5834
HLD301	0,3736	0,5003	0,6054
HLD53	0,3593	0,4724	0,6216
HLD97	0,3736	0,5003	0,6411
HLD152	0,3329	0,4246	0,5146
HLD128	0,3750	0,5030	0,6554
HLD134	0,3384	0,4341	0,5752

Marker	PIC	HET	PD
HLD305	0,3685	0,4901	0,5530
HLD48	0,3695	0,4921	0,6109
HLD114	0,3593	0,4724	0,6353
HLD304	0,3750	0,5031	0,6520
HLD131	0,3725	0,4982	0,6581
HLD38	0,3384	0,4341	0,5834
HLD82	0,3103	0,3865	0,5487
MIN	0,3066	0,3804	0,4664
MAX	0,3750	0,5031	0,6581

Stabilita při používání

Všechny studie stability byly naplánovány v souladu s normou ISO 23640:2015 a pokynem CLSI EP25 (2. vydání). Pro všechny studie stability byla provedena následující procedura: Souprava Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit byla testována v několika časových bodech po různé dlouhou dobu. Analýza vzorků chimérismu byla provedena pomocí ChimerisMonitor IVD, příjemce a dárce reprezentovala jednogenotypová DNA XY1726 a XX1180, v daném pořadí.

Analýzovali jsme jednogenotypovou DNA XY1726 ve vstupním množství DNA 1 ng a vzorky smíšeného chimérismu (MC) XY1726:XX1180 (příjemce:dárce) ve vstupním množství DNA 1 ng, které představují různé intervaly MC 4 % a 30 % MC. Pro stabilitu master mixu jsme testovali různé intervaly MC 30 %, 5 % a 2 % MC s 1 ng vstupní DNA pro 30 % a 5 % MC a 2 ng vstupní DNA pro 2 % MC.

Konečné hodnocení různých podmínek zahrnovalo srovnání průměrů 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 použití byly provedeny tři experimenty. Jeden pro testování stability po vystavení cyklům zmrazení a rozmrazení, jeden pro testování stability po různém zacházení s master mixem a druhý pro testování stability souprav během simulovaného použití po otevření.

Všechny testované vzorky v experimentu stability master mixu vykazovaly úplný profil markeru pro jednogenotypovou DNA XY1726 a byly pod

celkovou chybou založenou na limitech přesnosti a preciznosti testu pro tři testované vzorky MC: 30 %, 5 % a 2 % MC s jejich mezními hodnotami 3,31 %, 3,62 % a 1,77 %. Na soupravu Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit tak nemá jiný způsob zacházení s master mixem žádný vliv.

Pokud jde o stabilitu při zmrazování a rozmrazování, nevykazuje Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit žádné kritické nepřijatelné odchylky od T_0 a plný profil markeru pro jednogentypovou DNA XY1726 a u testovaných vzorků MC byly pod celkovými limity přesnosti testu založenými na chybách: 30 % a 4 % s jejich mezními hodnotami 3,31 % a 2,85 %. Souprava Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit je proto stabilní až po dobu 20 zmrazovacích a rozmrazovacích cyklů.

Na základě výsledků simulovaného použití po otevření je Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit stabilní pro použití po prvním otevření až 12 měsíců, stejně jako je stabilní po dobu až 20 zmrazovacích a rozmrazovacích cyklů.

Údaje o klinické funkční účinnosti

Plán studie, etické a regulační aspekty

Souprava Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a referenční metody byly testovány na vzorcích pacientů po alo-HSCT. 10 pacientů zařazených do této studie bylo monitorováno po alo-HSCT a obsah dárcovských vzorků byl během monitorování analyzován desetkrát po alo-HSCT. Cílem této studie bylo poskytnout klinické důkazy podle §§ 20 až 24 zákona o zdravotnických prostředcích 'Medizinproduktegesetz' (MPG verze ze 7. srpna 2002 (BGBl. I S 3146). Pomocí cytogenetické referenční metody FISH bylo třeba prokázat shodu s metodou PCR založenou na delečně inzertním polymorfismu prostředku. Potvrzení odpovědné etické komise bylo obdrženo dne 14. 3. 2012.

Referenční metody

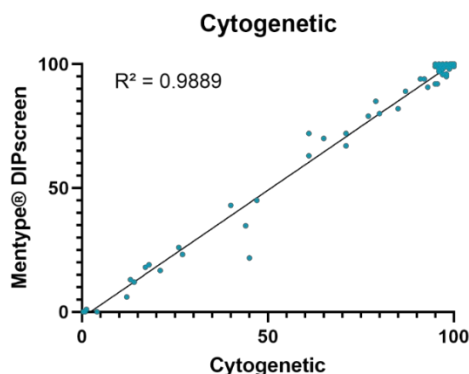
Jako referenční metoda byla provedena fluorescenční hybridizace na místě (FISH) s použitím soupravy specifické pro alozom CE-IVD CEP® X SpectrumOrange™ / Y SpectrumGreen™ Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden). Pro použití referenční metody byly do studie zahrnuty pouze dvojice dárce-příjemce různého pohlaví. V souladu s doporučeními výrobců byly hodnoceny pouze cytogenetické výsledky s počtem buněk > 200.

Extrakce a purifikace DNA

DNA byla izolována pomocí soupravy QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE). Izolace byla provedena podle protokolu výrobce.

Výsledky

Vysoká korelace mezi soupravou Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit a referenční cytogenetickou metodou s $R^2 = 0,9889$ potvrzuje použitelnost pro monitorování chimérismu po alo-HSCT.



Obrázek 4 Korelace cytogenetických a soupravy Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit jsou znázorněny v grafu. Lineární regrese vykazuje přijatelnou korelaci s koeficientem determinace 0,9889 (N = 87)

Výsledná shoda 94,25 % (akceptováno 5 % Δ MC) s výsledky referenční metody potvrzuje spolehlivost soupravy Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit pro interpretaci klinických dat.

Diagnostické hodnocení

Klinické charakteristiky funkční účinnosti vykazovaly přijatelné výsledky. Výsledky byly hodnoceny s ohledem na LoD PCR a cytogenetické 1 % (Bader et al. 2023 [5]). Parametry pro hodnocení klinické funkční účinnosti podle přílohy I, sekce 9.1b IVDR nebyly shledány zcela použitelnými pro soupravu Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit. Prostředek monitoruje rozsah analytu, nikoli jeho přítomnost. Posouzení negativního a pozitivního stavu analytu tedy není zcela použitelné.

Tabulka 19 Diagnostické charakteristiky

Diagnostické charakteristiky	Odhad	Dolní konfidenční interval	Horní konfidenční interval
Diagnostická citlivost	96,0 %	90,6 %	100,0 %
Diagnostická specifita	76,3 %	62,8 %	89,8 %
Diagnostická přesnost	87,5 %	80,6 %	94,4 %
Pozitivní prediktivní hodnota	84,2 %	74,7 %	93,7 %
Negativní prediktivní hodnota	93,5 %	84,9 %	100,0 %
Prevalence	56,8 %	46,5 %	67,2 %

Kontrola kvality

Všechny komponenty soupravy procházejí intenzivním procesem kontroly kvality v BIOTYPE GmbH. Kvalita testovací soupravy je trvale monitorována, aby byla zajištěna její neomezená použitelnost. V případě jakýchkoli dotazů týkajících se zajištění kvality nás prosím kontaktujte.

Technická pomoc

Pro technické poradenství se obraťte na náš tým Customer Support:

e-mail: support@biotype.de

telefon: +49 (0)351 8838 400

Reference

[1] Clark J, Scott S, Jack A, Lee H, Mason J, Carter G, Pearce L, Jackson T, Clouston H, Sproul A, Keen L, Molloy K, Folarin N, Whitby L, Snowden J, Reilly J, Barnett D (2014) Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): Technical recommendations for the use of Short Tandem Repeat (STR) based techniques, on behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leucocyte Immunophenotyping Chimerism Working Group. *British Journal of Haematology* 168, 26–37.

[2] Nollet F, Billiet D, Selleslag D, Criel A (2001) Standardisation of multiplex fluorescent short tandem repeat analysis for chimerism testing. *Bone Marrow Transplantation* 28, 511-518.

[3] Westgard S, Bayat H, Westgard JO (2018) Analytical Sigma metrics: A review of Six Sigma implementation tools for medical laboratories, *Biochemia medica*

[4] Pettersson L, Vezzi F, Vonlanthen S, Alwegren K, Hedrum A, Hauzenberger D (2021) Development and performance of a next generation sequencing (NGS) assay for monitoring of mixed chimerism, *Clinica Chimica Acta*

[5] Bader P, Bornhäuser M, Grigoleit G-U, Kröger N für die DAG-KBT, Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e.V. Monitoring, Chimärismusanalysen und Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD). Allogene Stammzelltransplantation. Onkopedia Leitlinien. Status March 2023 www.onkopedia.com.

Omezení použití

- Procedury uvedené v této příručce IFU je třeba dodržovat v souladu s popisem. Jakékoli odchylky mohou mít za následek selhání testu nebo způsobit chybné výsledky.
- Použití tohoto produktu je omezeno na odborné laboratorní uživatele, kteří jsou speciálně poučeni a vyškoleni v technikách PCR a kapilární gelové elektroforéze.
- Pro optimální funkční účinnost tohoto testu je nutné zajistit vhodné procedury odběru, přepravy, skladování a zpracování vzorků.
- Souprava byla validována pouze pro použití běhu se vzorky lidské periferní žilní plné krve na PCR přístrojích uvedených v kapitole Přístroje a software
- Tento test nesmí být použit přímo na vzorku. Před použitím tohoto testu je třeba provést vhodné metody extrakce nukleových kyselin.
- Kontaminace vzorků DNA krví zhoršuje výkonnost produktu. Zajistěte, aby během Extrakce DNA nedošlo ke kontaminaci, a v případě potřeby extrakci opakujte.
- Souprava byla validována pouze pomocí souprav popsanych v kapitole Činidla, soupravy a spotřební materiál pro extrakci a purifikaci DNA.
- K zajištění funkční účinnosti soupravy je nutná správná laboratorní praxe.
- Výsledky je nutné interpretovat po konzultaci s klinickými lékaři, kteří kombinují výsledky analýz chimérismu s výsledky jiných metod relevantních pro terapii nebo diagnostiku.
- Interpretace výsledků musí počítat s možností falešně negativních a falešně pozitivních výsledků.
- Soupravu Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit nelze použít, pokud jsou dárce a příjemce jednovaječná dvojčata.
- Dvojitá transplantace nebyla v rámci hodnocení funkční účinnosti validována.

- Vzorek obsahující degradovanou DNA může ovlivnit schopnost detekovat INDEL/DIP a pohlavně specifické lokusy
- Nepoužívejte prošlé nebo nesprávně skladované komponenty.
- Analýza chimérismu byla validována pomocí informativních markerů specifických pro pacienta (pro všechny rozsahy chimérismu).
- Vzorky z různých etnických skupin mohou vykazovat odlišné genetické charakteristiky, například různé alelické frekvence, což by mohlo omezit rozlišovací schopnost nebo zesílení. Byla hodnocena alelická frekvence některých markerů DIP v různých populacích. Kombinovaná rozlišovací schopnost je vysoká a její hodnoty přesahují 0,99. To naznačuje relativně nízké riziko, že test pacienta bude mít potíže s amplifikací. V současnosti jsou však k dispozici údaje pro bělošskou populaci. Potenciální dopad na ostatní etnické skupiny zatím nelze odhadnout.

Informace k objednávání

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

Produkt	Velikost balení	Objednací číslo
Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit	25 reakcí 100 reakcí	45-12300-0025 45-12300-0100
Matrix Standard BT5 multi	1 × 25 µL 2 × 25 µL	45-15100-0025 45-15100-0050
ChimerisMonitor IVD	demo licence licence na 1 rok licence na 3 roky	46-14800-0000

POZNÁMKA



Jednotlivé komponenty souprav nelze objednat samostatně.

Ochranné známky a prohlášení o vyloučení odpovědnosti

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

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

Na PCR se vztahují patenty. Patenty jsou společnosti Hoffmann-La Roche Inc. a F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Registrované názvy, ochranné známky apod. použité v tomto dokumentu, i když nejsou specificky jako takové, nelze považovat za nechráněné zákonem.

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

Produkt nemá licenci Health Canada a není ověřen nebo schválen FDA.

Zdravotnický prostředek není dostupný ve všech zemích.

© 2025 BIOTYPE GmbH; všechna práva vyhrazena.

Vysvětlení symbolů



Výrobce



Kód šarže



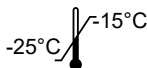
Obsah postačuje pro <N> testů



Prostudujte si elektronický návod k použití (eIFU)



Datum spotřeby



Omezení teploty



Katalogové číslo



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro



Uchovávejte mimo přímý dosah slunečních paprsků



Udržujte v suchu



Jedinečný identifikátor prostředku

Další označení použité v tomto návodu k použití:



Užitečné tipy



Pozor, dbejte na dodržování tohoto upozornění!

[modře podtržený text](#)

Odkazy vedoucí na externí obsah, jako jsou domovské stránky, e-mailové adresy

černě podtržený text

Křížové odkazy v dokumentu pro snadnou navigaci

odsazený, kurzivní, tučný text

Array, na která se má kliknout v softwaru

Příloha

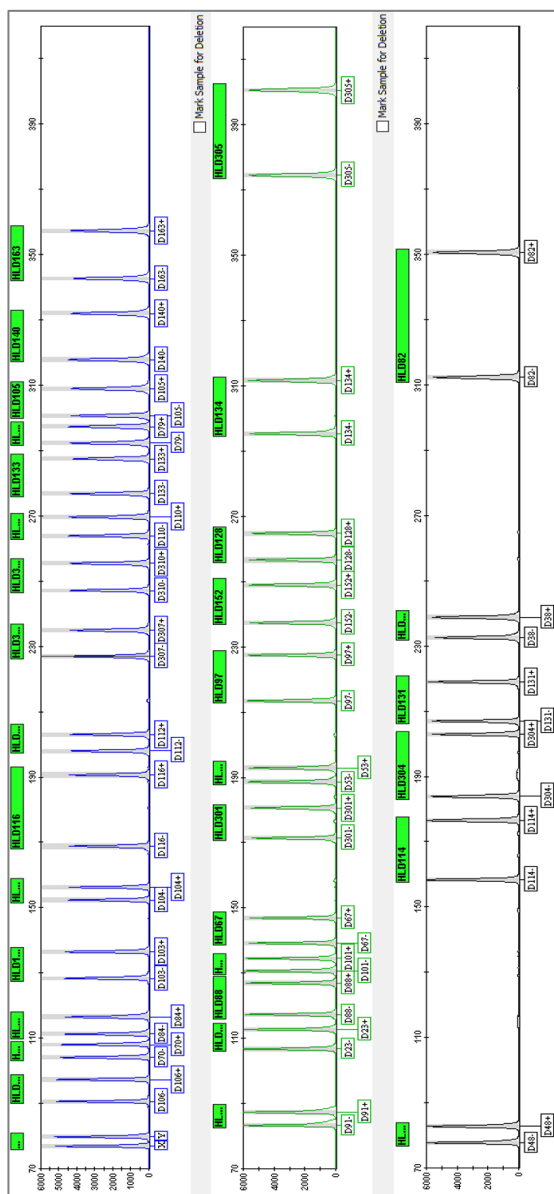
Elektroferogramy referenčních vzorků

Na následujících stránkách najdete příklady elektroferogramů Allelic Ladder Mentype® DIPscreen ([Obrázek 5](#)), Control DNA XY82 (PC, [Obrázek 6](#)) a kontroly bez templátu (NTC, [Obrázek 7](#)).

Všechny vzorky byly amplifikovány na PCR cykleru ProFlex a analyzovány na Genetic Analyzer Applied Biosystems™ 3500 (POP-4™, Array 36 cm) s použitím validovaného parametru běhu. Analýza dat byla provedena pomocí softwaru GeneMapper ID-X verze 1.6. Byly použity templáty Bins, Panels a Analysis Method podle [Tabulka 12](#).

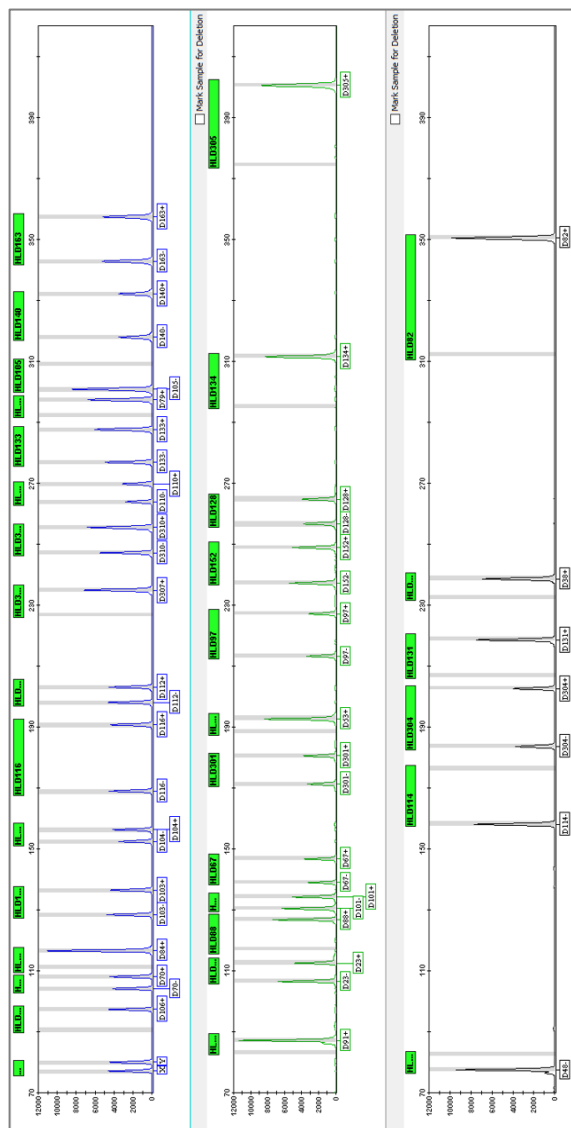
Elektroferogramy jsou zvětšeny na délku fragmentu 70 - 420 bp (osa x). Obecný rozsah pro analýzu délky fragmentu (osa x) pomocí soupravy Mentype® DIPscreen PCR Amplification Kit je 50 bp až 550 bp. Měřítko osy y bylo provedeno individuálně podle popisu pod každým obrázkem ([Obrázek 5](#), [Obrázek 6](#), [Obrázek 7](#)).

Mentype® DIPscreen Allelic Ladder



Obrázek 5 Allelic Ladder Mentype® DIPscreen
 Zvětšení na 6 000 RFU (osa y) a 70 – 420 bp (osa x)

Control DNA XY82 (PC)



Obrázek 6 Control DNA XY82 (PC)

Zvětšení na 12 000 RFU (osa y) a 70 – 420 bp (osa x)

Kontrola bez templátu (NTC)



Obrázek 7 Kontrola bez templátu (NTC)
Zvětšení na 1 000 RFU (osa y) a 70 – 420 bp (osa x)

Délky fragmentů a alel

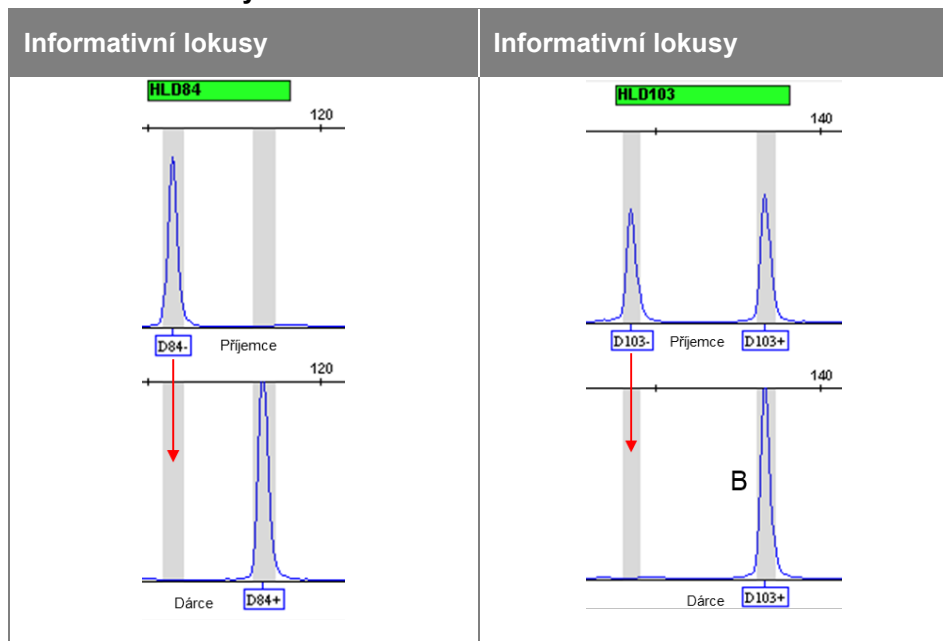
Tabulka 20 ukazuje délky fragmentů jednotlivých alel, které se vztahují k DNA Size Standard 550 (BTO). Všechny analýzy byly provedeny na Genetic Analyzer ABI PRISM® 310/3130 s POP-4™ polymer. Různé analytické přístroje, Size Standard DNA nebo polymery mohou vést k různým délkám fragmentu. Kromě toho se doporučuje vizuální zarovnání s alelickým žebříčkem.

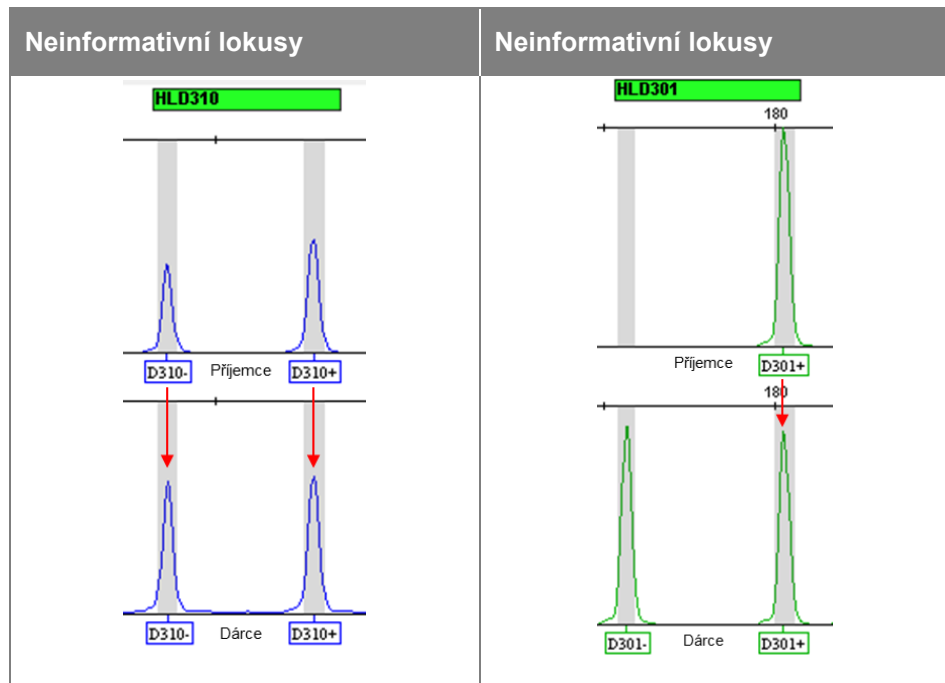
Tabulka 20 Délky fragmentů Allelic Ladder Mentype® DIPscreen analyzované na ABI PRISM® 3130 Genetic Analyser s POP-4™ polymerem, * zaokrouhleno na celé číslo

Marker/ modrý kanál	Velikost -DIP [bp]*	Velikost +DIP [bp]*	Marker/ zelený kanál	Velikost -DIP [bp]*	Velikost +DIP [bp]*
Amelogenin	77 (X)	80 (Y)	HLD91	84	88
HLD106	91	98	HLD23	107	113
HLD70	104	108	HLD88	118	128
HLD84	112	117	HLD101	131	135
HLD103	129	138	HLD67	140	148
HLD104	153	157	HLD301	172	182
HLD116	170	192	HLD53	190	194
HLD112	199	204	HLD97	214	228
HLD307	228	236	HLD152	239	250
HLD310	248	257	HLD128	258	266
HLD110	264	270	HLD134	296	312
HLD133	278	288	HLD305	375	401
HLD79	294	299	Marker/ žlutý kanál	Velikost -DIP [bp]*	Velikost +DIP [bp]*
HLD105	302	310			
HLD140	318	333			
HLD163	344	358			
			HLD48	78	83
			HLD114	159	177
			HLD304	184	203
			HLD131	208	220
			HLD38	234	240
			HLD82	314	352

Příklady kvalitativního hodnocení lokusů

Tabulka 21 Příklady kvalitativního hodnocení informativních lokusů



Tabulka 22 Příklad kvalitativního hodnocení neinformativních lokusů

BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Tel.: +49 351 8838 400

Fax: +49 351 8838 403

www.biotype.de

Objednávání

sales@biotype.de

Zákaznický servis a podpora

support@biotype.de

