



Mentype[®] Chimera[®] PCR Amplification Kit

Instrucciones de uso

El nuevo estándar en el análisis de quimerismo

Diagnóstico in vitro



CHNIFU01v5es
Marzo 2024



45-13210-0025
45-13210-0100
45-13210-0400



Denominación del lote



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

Made in Germany

BIOTYPE GmbH desarrolla, produce y distribuye aplicaciones basadas en PCR para diagnóstico clínico.

Nuestros kits de análisis Mentype® garantizan los más altos estándares de calidad para clínica e investigación.

En caso de duda o sugerencia estamos a su disposición. Contacte con nosotros o visite nuestra página web www.biotype.de

Mentype® Chimera®

Descripción del producto

Mentype® **Chimera**® es una aplicación de PCR múltiple para el análisis de quimerismo tras un trasplante de células madre hematopoyéticas y de médula ósea. El kit ha sido desarrollado especialmente para controlar el crecimiento de células del donante tras un trasplante. Mentype® **Chimera**® ha sido validado mediante el análisis de quimerismo en más de 200 parejas HLA donante-receptor. Además, la idoneidad del ensayo ha sido comprobada y confirmada en una evaluación del rendimiento clínico. El kit se utiliza con éxito en el diagnóstico clínico rutinario.

Los marcadores genéticos de Mentype® **Chimera**® se distribuyen a lo largo de 12 cromosomas, y representan microsatélites (STRs) muy polimórficos con un elevado grado de heterocigosidad y una distribución equilibrada de alelos. Estas características aumentan la posibilidad de identificar los loci para la diferenciación del donante/receptor y garantizan así la seguridad y la solidez del análisis de quimerismo.

Con Mentype® **Chimera**® se amplifican simultáneamente en una aplicación de PCR los doce loci autosómicos muy polimórficos **D2S1360, D3S1744, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517, D8S1132, D10S2325, D12S391, D18S51, D21S2055, SE33 (ACTBP2)** y el locus **amelogenina** específico del sexo. Los cebadores están marcados con los colorantes fluorescentes **6-FAM, BTG o BTY**.

El límite de detección para el kit Mentype® **Chimera**® es de **200 pg de ADN genómico**. El intervalo óptimo en condiciones estándar es de **0,2-1,0 ng de ADN**.

La validación y evaluación del kit de análisis se ha llevado a cabo en los equipos termociclador GeneAmp® 9700 Aluminium, Eppendorf Mastercycler ep-S, Biometra T1, ProFlex PCR System, analizador genético ABI PRISM® 310 con POP-4™, analizador genético ABI PRISM® 3130 o 3500 con POP-4™ y analizador genético SeqStudio™ con POP-1™.

Índice de contenido

1. Descripción de Mentype® Chimera®	5
2. Amplificación por PCR	8
2.1 Composición de la mezcla maestra	8
2.2 Parámetros de amplificación por PCR.....	9
3. Electroforesis capilar en gel.....	11
3.1 Preparación de los productos de PCR.....	11
3.2 Análisis de la fragmentos.....	11
4. Evaluación	13
4.1 Archivos de plantillas BIOTYPE	14
4.2 Controles.....	15
4.3 Longitud de fragmentos y alelos.....	15
5. Interpretación de los resultados	21
6. Datos de la genética de poblaciones	23
7. Referencias	26
8. Explicación de los símbolos	27
Especificaciones del kit Mentype® Chimera® de amplificación por PCR..	28
A Validación analítica	28
A a) Determinación de la reacción estándar y de las tolerancias específicas del lote	28
A b) Evaluación de la precisión del genotipado	28
A c) Evaluación de la especificidad analítica	29
A d) Evaluación de la sensibilidad analítica	29
A e) Evaluación de distintos termocicladores de PCR.....	29
A f) Evaluación de distintas muestras variadas de ADN	30
A g) Evaluación del efecto de distintas temperaturas de hibridación en la PCR	30
A h) Evaluación de distintos lotes de buffer para PCR.....	31
A i) Análisis de inhibidores de PCR.....	31
A j) Vida útil desde su apertura	31
B Datos del rendimiento clínico	32
B a) Muestreo y aspectos éticos y normativos.....	32
B b) Pruebas comparativas	32
B c) Extracción de ADN y purificación.....	32
B d) Resultados.....	32
B e) Referencias	33

1. Descripción de Mentype® Chimera®

Tabla 1. Información específica del locus para Mentype® Chimera®

Locus	N.º acceso GenBank®	Patrón de repetición del alelo de referencia	Alelo de referencia	Intervalo de alelos
Amelogenina X	M55418			
Amelogenina Y	M55419			
D2S1360	G08130	[TATC] ₉ [TGTC] ₉ [TATC] ₅	23	19-32
D3S1744	G08246	[TCTA] ₂ TA[TCTA] ₁₂ TCA [TCTA] ₂	16	13-22
D4S2366	G08339	[ATAG] ₉ ATTG [ATAG] ₂	12	9-15
D5S2500	G08468	[ATAG] ₁₂	12	9-18
D6S474	G08540	[TAGA] ₅ TGA [TAGA] ₁₂	17	11-20
D7S1517	G18365	[GAAA] ₁₁ CAAA [GAAA] ₂ CAAA [GAAA] ₂	17	14-31
D8S1132	G08685	[TCTA] ₉ TCA [TCTA] ₉ TCTGTCTA	20	12.1-27
D10S2325	G08790	[TCTTA] ₁₂	12	6-23
D12S391	G08921	[AGAT] ₅ GAT [AGAT] ₇ [AGAC] ₆ AGAT	19.3	13-28
D18S51	L18333	[AGAA] ₁₃	13	5.3-42
D21S2055	G27274	[CTAT] ₂ CTAA [CTAT] ₉ CTA [CTAT] ₃ TAT [CTAT] ₃ TAT [CTAT] ₄ CAT[CTAT] ₂	24	16.1-39
SE33 (ACTBP2)	NG000840	[AAAG] ₉ AA [AAAG] ₁₆	25.2	3-50

La tabla 1 muestra los loci STR con sus patrones de repetición y alelos. La nomenclatura se ajusta a las directrices de la «Sociedad Internacional de Genética Forense, (ISFG)» (Bär *et al.*, 1997). En el caso de los loci STR D8S1132 y D12S391 se aplica la nomenclatura según Hering y Müller (2001); para los loci D4S2366 y D6S474 la nomenclatura según Becker *et al.* (2007); para el locus D10S2325, la nomenclatura según Wiegand *et al.* (1999); y para el locus D7S1517, se aplica la nomenclatura según Wiegand y Klintschar (2002). El intervalo de alelos indicado tiene en cuenta los alelos conocidos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, versión 12/2008) así como la bibliografía actual.

Tabla 2. Mapa cromosómico para Mentype® Chimera®

Locus	Mapa cromosómico
Amelogenina X	Xp22.1-22.3
Amelogenina Y	Yp11.2
D2S1360	2p24-p22
D3S1744	3p24
D4S2366	4p16-15.2
D5S2500	5q11.2
D6S474	6q21-22
D7S1517	7q31.33
D8S1132	8q23.1
D10S2325	10p12
D12S391	12p13.2
D18S51	18q21.3
D21S2055	21q22
SE33	6q14.2

Contenido

Mentype® Chimera®

Etiqueta	Contenido	Volumen		
		25 Reacciones	100 Reacciones	400 Reacciones
Nuclease-Free Water	Agua libre de nucleasas	1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Mezcla de reacción A	125 µL	500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® Chimera® Primer Mix	Mezcla de cebador	63 µL	250 µL	4 x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	ADN polimerasa Multi Taq 2	10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® Chimera® Control DNA XY1726	ADN de control XY1726 (2 ng/µL)	10 µL	10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Patrón de tamaño molecular 550 (BTO)	13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® Chimera® Allelic Ladder	Escalera alélica	25 µL	25 µL	4 x 25 µL

Tenga en cuenta que los componentes de los diferentes lotes de kits no deben mezclarse. Se puede encontrar una vista general de los números de lote en la etiqueta situada en el interior de la tapa de la caja. No está permitido utilizar alícuotas de los componentes del kit en otros recipientes de reacción.

Información del pedido

Product	Packaging size	Order number
Mentype® Chimera®	25 reactions	45-13210-0025
Mentype® Chimera®	100 reactions	45-13210-0100
Mentype® Chimera®	400 reactions	45-13210-0400

Nota: Tenga en cuenta que el tamaño de embalaje 1000 para reacciones ya no está a la venta.

Almacenamiento

Se almacena a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C. Debe evitarse la descongelación y la congelación repetidas. La mezcla de cebador y la escalera alélica deben almacenarse protegidas de la luz. El ADN de control y los reactivos post-PCR (escalera alélica y patrón de longitud de ADN) deben almacenarse separados de los reactivos de PCR. El período de validez del kit de análisis figura en la etiqueta del envase.

Otros reactivos

En el caso de la amplificación por PCR y la preparación de la muestra, además de los componentes incluidos en el kit de análisis, se requieren los reactivos siguientes:

Tabla 3. Otros reactivos requeridos para la ejecución de Mentype® Chimera®

Reactivo	Proveedor	Número de pedido
Formamida Hi-Di™, 25 mL	Life Technologies Corporation	4311320
Matrix Standards BT5 multi-capillary instruments (25 µL)	BIOTYPE GmbH	00-10421-0025
Matrix Standards BT5 multi-capillary instruments (2 x 25 µL)	BIOTYPE GmbH	00-10421-0050

Advertencias e indicaciones de seguridad

Por favor, observe la ficha de seguridad.

A petición están disponibles las fichas de seguridad de los componentes del kit. Para las fichas de seguridad de los reactivos no incluidos en el kit de análisis deberá contactar con el fabricante correspondiente.

Control de calidad

El contenido íntegro del kit está sujeto a un control de calidad intenso por parte de BIOTYPE GmbH. La calidad de los kits de análisis se examina continuamente para demostrar su utilización ilimitada. Le rogamos se ponga en contacto con nosotros en relación con todas las cuestiones relacionadas con el control de calidad.

Marcas y patentes

Mentype® y Chimera® son marcas registradas de BIOTYPE GmbH. ABI PRISM® y GeneScan® son marcas registradas en Alemania de Applied Biosystems LLC; GeneMapper®, GeneAmp® y Applied Biosystems® son marcas registradas de Applied Biosystems LLC. POP-4™ /POP-1™ son marcas comerciales de Thermo Fisher Scientific y sus filiales, a menos que se especifique lo contrario. La PCR goza de la protección de patente. Los titulares de la patente son las empresas Roche Molecular Systems y F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Protocolos para la amplificación por PCR, electroforesis y evaluación

2. Amplificación por PCR

2.1 Composición de la mezcla maestra

La siguiente tabla muestra los volúmenes de los componentes del kit utilizados en 1,0 µL de volumen de muestra (patrón de ADN) en un volumen de reacción de 25 µL. Para la cantidad de reacciones de PCR que deban llevarse a cabo, tenga en cuenta los controles positivos y negativos. Añada al número total una o dos reacciones para compensar los errores de pipeteo.

Tabla 4. Composición de la mezcla maestra para Mentype® Chimera®

Componentes	Volumen
Nuclease-Free Water	16,1 µL
Reaction Mix A*	5,0 µL
Mentype® Chimera® Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (arranque en caliente, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Cantidad total de la mezcla maestra	24,0 µL

* contiene Mg²⁺, dNTPs, BSA

Todos los reactivos deben mezclarse antes de componer la mezcla maestra (con agitador vórtex) y centrifugarse brevemente (aprox. 10 s). La cantidad de ADN que vaya a utilizarse viene determinada por su concentración. En el caso de las muestras de referencia, en general es suficiente con 1 µL. En caso de muestras críticas de pacientes, la cantidad de patrón puede aumentarse correspondientemente. La cantidad de agua libre de nucleasas se debe corregir en consecuencia, de modo que el volumen total de la composición para la PCR sea siempre de 25 µL.

Almacene sus muestras de ADN en agua libre de nucleasas o en un buffer TE diluido (10 mM Tris HCl, pH 8.0 y 1 mM EDTA), p. ej. 0,1 x TE buffer.

La mezcla de cebador se ajusta de tal manera que en **30 ciclos de PCR con 0,5 ng de ADN de control XY1726** se alcancen alturas de picos equilibrados en un volumen de reacción de 25 µL. En el caso de que se utilice más ADN patrón, se alcanzarán picos muy altos con fragmentos pequeños de PCR y picos proporcionalmente bajos con fragmentos mayores de PCR. Reduzca la cantidad de ADN para corregir ese desequilibrio.

Control positivo

Para el control positivo, diluya el ADN de control XY1726 a 0,5 ng/µL en el volumen correspondiente. Pipetee el ADN de control diluido en lugar del ADN patrón en el pocillo de la reacción con la mezcla maestra para la PCR correspondiente.

Control negativo

Como control negativo pipetee agua libre de nucleasas en lugar del ADN patrón en el recipiente de reacción con la mezcla maestra para la PCR.

ADN patrón

Dependiendo del método de cuantificación aplicado, el valor de medición de la concentración de ADN puede variar, de modo que, dado el caso, se deberá adaptar correspondientemente la cantidad de ADN óptima.

2.2 Parámetros de amplificación por PCR

Para activar la ADN polimerasa Multi Taq 2 y eliminar la formación de productos de amplificación inespecíficos, es importante iniciar un «arranque en caliente».

El número de ciclos depende de la cantidad de ADN. Para todas las muestras se recomienda 30 ciclos de PCR. Para material crítico (< 100 pg de ADN) se recomienda hasta 32 ciclos para lograr una intensidad de señalización óptima.

Método estándar

Recomendado para todas las muestras de ADN

Tabla 5. Protocolo estándar de amplificación para PCR

Temperatura	Tiempo	
94 °C	4 min (arranque en caliente para la activación de la ADN polimerasa Multi Taq2)	
94 °C	30 s	30 ciclos
60 °C	120 s	
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	
		hasta el final

Opcional

Recomendado para cantidades pequeñas de ADN

Tabla 6. Protocolo opcional de amplificación de PCR para pequeñas cantidades de ADN

Temperatura	Tiempo	
94 °C	4 min (arranque en caliente para la activación de la ADN polimerasa Multi Taq2)	
94 °C	30 s	32 ciclos
60 °C	120 s	
72 °C	75 s	
68 °C	60 min	
10 °C	∞	hasta el final

Observación: En el caso de equipos de PCR que ofrecen velocidades rápidas de calentamiento y refrigeración (> 2 °C/s) recomendamos ajustar la rampa en 2 °C/s para un equilibrio óptimo del kit.

Debido a las escasas cantidades de ADN puede haber descensos estadísticos (pérdida de alelos) y alturas de pico desequilibradas. Además, aumenta la probabilidad de productos de amplificación inespecíficos. Con un número de ciclos creciente puede producirse también una contaminación cruzada con cantidades mínimas de ADN extraño.

3. Electroforesis capilar en gel

3.1 Preparación de los productos de PCR

Al final de la PCR, retire las muestras del termociclador y centrifúguelas brevemente. Descongele los reactivos formamida Hi-Di™ (no incluida en el kit) y DNA Size Standard 550 (BTO), mezcle los tubos de ensayo brevemente y centrifúguelos brevemente. Prepare la composición descrita en la tabla 7 de formamida Hi-Di™ y el patrón de tamaño BTO (550), y añada a la mezcla exceso para una o dos reacciones para compensar las variaciones producidas por el pipeteo.

Tabla 7. Composición de la mezcla de desnaturalización

Componentes	Volumen por reacción
Formamida Hi-Di™	12,0 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µL

Pipetee 12 µL de la mezcla de desnaturalización de formamida y DNA Size Standard 550 (BTO) en la cantidad correspondiente de pocillos de una placa de PCR (adecuada para su uso en un analizador genético). Después, añada o bien 1 µL de producto de PCR, o bien 1 µL de escalera alélica (Allelic Ladder) de Mentype® **Chimera**® por pocillo. Tape la placa de PCR con un cubre adhesivo adecuado, mézclela en el vórtex y centrifugue la placa brevemente. Retire el cubre adhesivo y tape la placa con la tapa del fabricante del aparato.

Nota: La escalera alélica se utiliza para determinar correctamente los fragmentos analizados durante el análisis de datos. En cada análisis de fragmentos, la escalera alélica debe ser analizada al menos una vez para garantizar el análisis satisfactorio de los datos.

Nota: Los capilares del aparato de electroforesis en gel no deben estar secos. Si las muestras no ocupan todas las posiciones de los capilares, rellene los pocillos restantes de la placa con 12 µL de formamida Hi-Di™ según el número de capilares.

Desnaturalice los productos de PCR preparados en un termociclador de PCR durante 3 minutos a 95 °C, enfríe las muestras en un ciclador a 4 °C. Centrifugue brevemente las muestras antes de ejecutar el análisis de fragmentos.

3.2 Análisis de la fragmentos

Se pueden encontrar instrucciones generales sobre el analizador, la producción de la matriz y la aplicación del software GeneMapper™ en el manual correspondiente *ABI PRISM® Genetic Analyzer User's Manual*.

Después de haber efectuado la calibración espectral del dispositivo de electroforesis capilar en gel con el reactivo Matrix Standard BT5 (BIOTYPE GmbH), cree un módulo

de funcionamiento específico (ABI 3130, SeqStudio™) o un protocolo de instrumentos (ABI 3500) con los siguientes parámetros:

Tabla 8. Parámetros de funcionamiento específicos para el análisis de la fragmentos de Mentype® **Chimera**®

	ABI 3130	ABI 3500	SeqStudio™
Injections Voltage [kV]	3.0	3.0	1.2
Injection Time [s]	10	10	10
Run Voltage [kV]	default	15 (36 cm Array) 19.5 (50 cm Array)	9
Run Time [s]	1560	1560	1560

No obstante lo dispuesto en los valores de la tabla 8, el tiempo de ejecución puede ajustarse para analizar todos los fragmentos (60-550 bp) del patrón de tamaño 550.

Nota: Siga las instrucciones del fabricante del equipo de electroforesis capilar en gel para ajustar los parámetros de funcionamiento específicos.

Nota: Tenga en cuenta asimismo la información adicional sobre calibración y aplicación de los productos Mentype® en aparatos de electroforesis capilar en gel. Esta puede solicitarse a BIOTYPE GmbH a través de support@biotype.de.

4. Evaluación

Se pueden encontrar instrucciones generales para la evaluación automática en el manual correspondiente *ID/ID-X Software User's Manual* de *GeneMapper®*.

Observación: El panel rojo debe ocultarse con *Mentype® Chimera®*.

La determinación de la longitud exacta del fragmento de los productos amplificados depende del tipo de aparato, de las condiciones de la electroforesis y del patrón de tamaño de ADN. Debido a la complejidad de algunos loci STR, debe utilizarse el número máximo de puntos de referencia equidistantes para la determinación de la longitud. Para ello, utilice el patrón de tamaño de ADN 550 (BTO) con las longitudes de fragmentos **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 y 550 bp**.

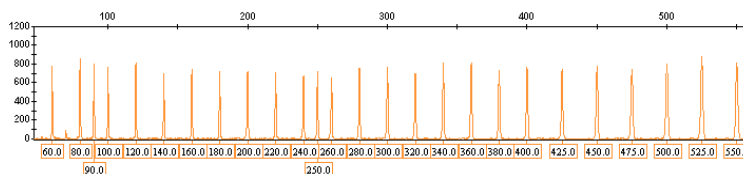


Imagen 1 Electroferograma del patrón de tamaño molecular 550 (BTO), longitud del fragmento en bp

Observación: Para la evaluación y el análisis de *Mentype® Chimera®* con el software *ID/ID-X* de *GeneMapper®* puede utilizarse el archivo de plantillas facilitado del patrón de longitud de ADN SST BTO_60-500pb.

4.1 Archivos de plantillas BIOTYPE

La clasificación de los productos de PCR fraccionados (genotipado) puede realizarse con ayuda de un software de evaluación adecuado, p. ej. con el software ID/ID-X de GeneMapper® en combinación con los archivos de plantillas Mentype® Chimera® de BIOTYPE. Los archivos de plantillas BIOTYPE (Template Files) pueden descargarse en nuestra página web (www.biotype.de).

Los archivos de plantillas de BIOTYPE recomendados para el software ID/ID-X de GeneMapper® son:

Panels	Chimera_Panels_v2/v2X*	o una versión superior
BinSets	Chimera_Bins_v2/v2X*	o una versión superior
Size Standard	SST-BT0_60-500bp	
Analysis Method	Analysis_HID_310	
	Analysis_HID_3130	
	Analysis_HID_310_50rfu	
	Analysis_HID_3130_50rfu	
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 Alleles	
	Table for 10 Alleles	

Los paneles y conjuntos de bins deben ser utilizados siempre, el resto de archivos de plantillas son opcionales.

Otros archivos de plantillas recomendados de BIOTYPE para el software ID-X de GeneMapper® son:

Stutter*	Chimera_Stutter_v2X#	o una versión superior
----------	----------------------	------------------------

* Al cargar los paneles mencionados anteriormente no se aceptan los ajustes del stutter, por lo que el archivo del stutter debe ser importado de forma adicional.

Aviso importante: La importación y la clasificación de alelos mediante los archivos de plantillas ofrecidos solo puede garantizarse para el software ID/ID-X de GeneMapper® : En caso de tener que utilizar GeneMapper® pueden surgir problemas al importar algunos archivos de plantillas. En este caso, debería adaptar los paneles y bins a la configuración específica de su equipo con una o varias ejecuciones de la escalera alélica. En caso de requerir ayuda, contacte con nuestro servicio de asistencia técnica (support@biotype.de).

Procedimiento general para ejecutar la evaluación

- 1. Compruebe el patrón de tamaño molecular (Size Standard)
- 2. Compruebe la escalera alélica (Allelic Ladder)
- 3. Compruebe el control positivo
- 4. Compruebe el control negativo
- 5. Evaluar los datos de las muestras

4.2 Controles

El ADN de control XY1726 incluido en Mentype® **Chimera**® así como los ADNs disponibles en el mercado representan los siguientes alelos:

Tabla 9. Clasificación de alelos con Mentype® **Chimera**®

Locus	ADN de control XY1726	ADN de control XY5	ATCC K-562	CCR 9947A	CCR 9948	CCR 3657
Amelogenina	X/Y	X/Y	X/X	X/X	X/Y	X/Y
D2S1360	25/29	22/25	20/28	23/24	22/25	22/23
D3S1744	14/18	17/18	18/18	17/17	18/18	14/17
D4S2366	9/11	9/12	13/13	11/13	9/14	9/14
D5S2500	10/17	10/11	15/15	15/16	11/15	11/16
D6S474	14/15	15/16	14/17	13/17	16/16	15/16
D7S1517	19/25	22/27	21/24/25	19/25	20/22	24/25
D8S1132	18/22	18/20	20/24	19/21	20/24	17/18
D10S2325	9/11	13/14	7/13	9/10	8/14	9/14
D12S391	21/25	17/19	23/23	18/20	18/24	18/19
D18S51	12/13	13/15	15/16	15/19	15/18	12/20
D21S2055	19.1/21.1	25/27	28/35	19.1/26	19.1/26	19.1/25
SE33	26.2/28.2	15/21.2	26.2/28.2	19/29.2	23.2/26.2	22.2/27.2

En la tabla se muestran los alelos de ADNs de referencia disponibles en ATCC y en el Depósito Coriell. De este modo se cumplen los requisitos de Szibor *et al.* (2003).

4.3 Longitud de fragmentos y alelos

Los valores especificados en la tabla 10 a la tabla 12 para longitudes de fragmento de alelos individuales se refieren al patrón de tamaño molecular 550 (BTO) y la medición en el analizador genético ABI PRISM® 3130 con polímero POP-4®. Pueden producirse variaciones al utilizar otros equipos de análisis, otros patrones de tamaño molecular u otros polímeros.

Debido a la diferencia específica del equipo se recomienda el ajuste individual del equipo a utilizar (fine tuning) tras la medición de fragmentos análisis de fragmentos. Además, se debe llevar a cabo una comparación visual con la escalera alélica.

Escalado

Horizontal: 70-480 bp

Vertical: según la intensidad de la señal de las muestras

Imagen 2



Imagen 2 Electroferograma de Mentype® **Chimera**® utilizando 500 pg de ADN de control XY1726. El análisis se ha realizado en el analizador genético ABI PRISM® 3130 con el patrón de longitud de ADN 550 (BTO). La clasificación de alelos ha sido realizada con el software ID de GeneMapper® y el archivo de plantillas Mentype® **Chimera**®.

Imagen 3

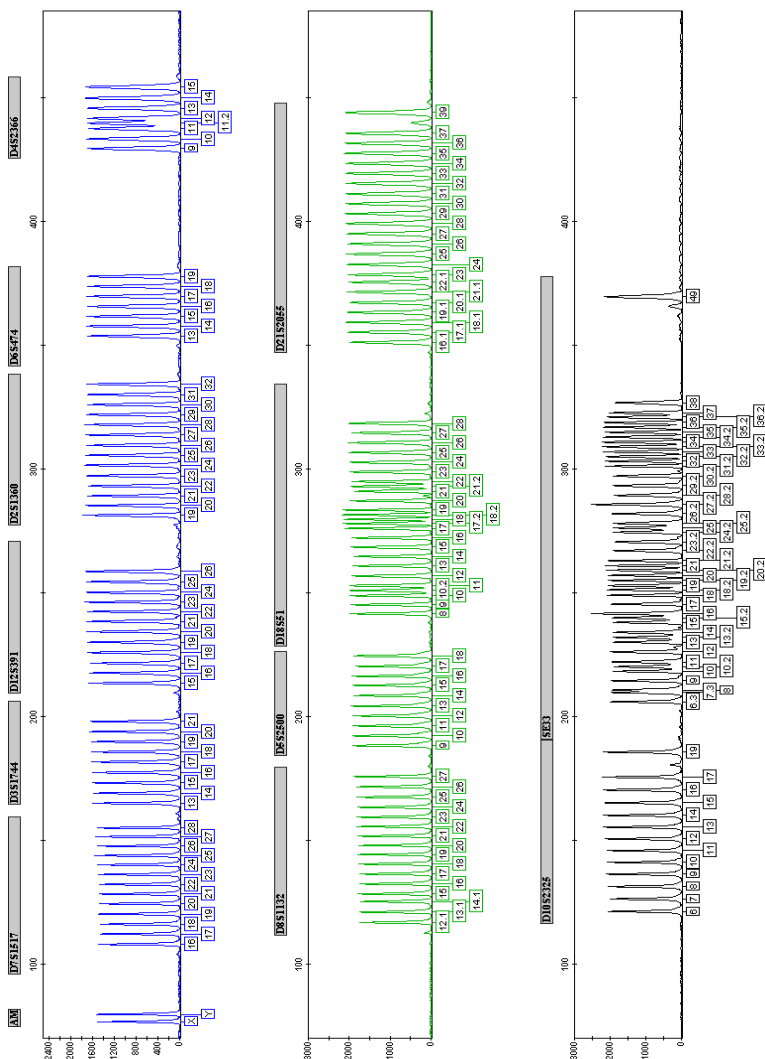


Imagen 3 Electroferograma de la escalera alélica Mentype® **Chimera**® analizado en el analizador genético ABI PRISM® 3130 . La clasificación de alelos ha sido realizada con el software ID de GeneMapper® y el archivo de plantillas Mentype® **Chimera**®.

Tabla 10. Longitudes de fragmentos de la escalera alélica Mentype® **Chimera**® medidas en el analizador genético ABI PRISM® 3130 con polímero POP-4™ (panel azul)

Marcador/ alelo	Tamaño [bp]*	Otros alelos**	Marcador/ alelo	Tamaño [bp]*	Otros alelos**	Marcador/ alelo	Tamaño [bp]*	Otros alelos**
Amelogenin a	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	
			18	226	18.3	16	366	
D7S1517	6-FAM		19	230	19.1, 19.3	17	370	
16	108	14, 15	20	234	20.3	18	374	
17	112		21	238		19	378	
18	116		22	242				
19	120							
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				
			23	297				
D3S1744	6-FAM							
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				

Tabla 11. Longitudes de fragmentos de la escalera alélica Mentype® **Chimera**® medidas en analizador genético ABI PRISM® 3130 con polímero POP-4™ (panel verde)

Marcador/ alelo	Tamaño [bp]*	Otros alelos**	Marcador/ alelo	Tamaño [bp]*	Otros alelos**	Marcador/ alelo	Tamaño [bp]*	Otros alelos* *
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							

Tabla 12. Longitudes de fragmentos de la escalera alélica Mentype® **Chimera**® medidas en el analizador genético ABI PRISM® 3130 con polímero POP-4™ (panel amarillo)

Marcador/ alelo	Tamaño [bp]*	Otros alelos**	Marcador/ alelo	Tamaño [bp]*	Otros alelos**	Marcador/ alelo	Tamaño [bp]*	Otros alelos**
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				

* redondeado a números enteros

** Estos alelos fuera de la escalera alélica o «off ladder» del pool de ADN de BIOTYPE han sido clasificados con los archivos de plantilla actuales de BIOTYPE para el software ID/ID-X de GeneMapper®. Para otros alelos véase, entre otros, http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm

† Para una mejor orientación, estos alelos han sido representados dentro de la escalera alélica en negrita.

5. Interpretación de los resultados

Mediante la evaluación descrita anteriormente con clasificación automática de alelos se garantiza una diferenciación exacta y fiable de los alelos.

A partir de los datos sin procesar de un análisis de fragmentos se puede realizar directamente un cálculo de la proporción de ADN del donante.

Para poder comparar resultados obtenidos con Mentype® **Chimera**® con los resultados de análisis citológicos (análisis FISH) se deben utilizar al menos 500 leucocitos en el análisis citológico.

Superposiciones (Pull-up Peaks o picos de pequeña intensidad)

Pueden producirse superposiciones entre los cromatogramas en el caso de que se utilice una matriz no adecuada para el análisis o existan alturas de picos fuera del rango de detección lineal del equipo. Las superposiciones pueden reconocerse porque aparecen en la misma posición que picos específicos pero en otros paneles cromáticos (por lo general, con bajas intensidades de señal).

Bandas stutter (Stutter Peaks o picos stutter)

La aparición de bandas stutter depende de la secuencia y del número de unidades de repetición. En el caso de las secuencias de tetranucleótidos STR, estas ocurren debido a un error de la ADN polimerasa Taq durante los picos n-4 de la PCR, es decir, el pico stutter es 4 bases menor que el alelo real. Las unidades de repetición son omitidas en el STR. Para evaluar los picos se aplican los modelos de los archivos de plantillas para el software ID/ID-X de GeneMapper™.

Acumulación de nucleótidos independiente del molde

Debido a su actividad de transferasa terminal, la ADN polimerasa Taq tiende a adherir una adenosina al extremo 3' del fragmento de ADN amplificado. Dicha adherencia no ocurre cuando el sistema de PCR no cuenta con el tiempo suficiente para la extensión o cuando las secuencias de cebadores no favorecen la extensión. Este artefacto es reconocible por la aparición de un fragmento acortado en una base (pico de -1 bp). Todos los cebadores BIOTYPE están diseñados de tal forma que dicha formación de artefactos queda minimizada. La formación del artefacto se reduce además por el paso final de extensión en el protocolo de PCR (68 °C durante 60 min). La altura del pico del artefacto disminuye con grandes cantidades de ADN. Para la evaluación de los picos, cada laboratorio de análisis debe establecer sus propios valores máximos.

Artefactos

La temperatura ambiente puede afectar al comportamiento de los productos de PCR en unidades capilares y, a baja temperatura, pueden aparecer shoulder peaks o picos dobles (Split Peaks). La clasificación automática de alelos puede, además, verse afectada. En el caso de observarse dichos efectos, recomendamos inyectar de nuevo la muestra con más escaleras alélicas por ciclo.

Influencia del tipo de polímero

Mentype® **Chimera**® ha sido validado y certificado en POP-4™. El uso de otro polímero (p. ej. POP-7™ o POP-6™) puede modificar el comportamiento y la forma de los picos de los productos específicos de PCR. Además, se observó un aumento del ruido de fondo a través de un cambio en el comportamiento de los residuos de colorante fluorescente libre.

6. Datos de la genética de poblaciones

Los datos de la genética de poblaciones más relevantes para cada marcador STR están indicados en las tablas 13-16. La fórmula para el cálculo del **contenido de información del polimorfismo** (PIC) fue publicada por Botstein *et al.* (1980) , la fórmula para la **heterocigosidad esperada** (HET) por Nei y Roychoudhury *et al.* (1974), y la fórmula para el cálculo del **poder de discriminación** (PD) por Jones *et al.* (1972). Todas las fórmulas son aptas para marcadores autosómicos.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 - 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n f_i^2 f_j^2$$

$$HET = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{j=1}^K f^2 \right)$$

$$PD = 1 - \sum_i f_i^2$$

Tabla 13. Datos de la genética de poblaciones

Marcador D2S1360		Marcador D3S1744		Marcador D4S2366	
Alelo	Frecuencia alélica	Alelo	Frecuencia alélica	Alelo	Frecuencia alélica
19	0.007	13	0.007	9	0.347
20	0.126	14	0.104	10	0.179
21	0.060	15	0.053	11	0.074
22	0.309	16	0.100	12	0.147
23	0.142	17	0.319	13	0.168
24	0.098	18	0.197	14	0.074
25	0.086	19	0.130	15	0.011
26	0.093	20	0.067		
27	0.035	21	0.023		
28	0.023				
29	0.012	PIC	0.790	PIC	0.760
30	0.002	PD	0.943	PD	0.919
31	0.005	HET	0.792	HET	0.795
32	0.002				
PIC	0.820				
PD	0.955				
HET	0.856				

Tabla 14. Datos de la genética de poblaciones

Marcador D5S2500		Marcador D6S474		Marcador D7S1517	
Alelo	Frecuencia alélica	Alelo	Frecuencia alélica	Alelo	Frecuencia alélica
9	0.007	13	0.246	16	0.007
10	0.084	14	0.212	17	0.007
11	0.313	15	0.154	18	0.049
12	0.161	16	0.285	19	0.120
13	0.061	17	0.097	20	0.101
14	0.042	18	0.005	21	0.099
15	0.213			22	0.082
16	0.103	PIC	0.740	23	0.077
17	0.009	PD	0.918	24	0.155
18	0.007	HET	0.733	25	0.230
				26	0.054
PIC	0.780			27	0.014
PD	0.938			28	0.005
HET	0.804				
				PIC	0.860
				PD	0.967
				HET	0.826

Tabla 15. Datos de la genética de poblaciones

Marcador D8S1132		Marcador D10S2325		Marcador D12S391	
Alelo	Frecuencia alélica	Alelo	Frecuencia alélica	Alelo	Frecuencia alélica
16	0.007	6	0.002	15	0.035
17	0.095	7	0.102	16	0.019
18	0.221	8	0.056	17	0.107
19	0.153	9	0.121	17.3	0.019
20	0.128	10	0.142	18	0.215
21	0.119	11	0.144	18.3	0.007
22	0.133	12	0.193	19	0.121
23	0.077	13	0.133	19.3	0.016
24	0.056	14	0.065	20	0.117
25	0.005	15	0.037	21	0.093
26	0.005	16	0.005	22	0.114
27	0.002			23	0.072
		PIC	0.860	24	0.040
PIC	0.850	PD	0.967	25	0.021
PD	0.964	HET	0.851	26	0.002
HET	0.828				
				PIC	0.870
				PD	0.971
				HET	0.893

Tabla 16. Datos de la genética de poblaciones

Marcador D18S51		Marcador D21S2055		Marcador SE33 (ACTBP2)	
Alelo	Frecuencia alélica	Alelo	Frecuencia alélica	Alelo	Frecuencia alélica
10	0.005	16.1	0.056	11	0.002
12	0.103	17.1	0.021	12	0.014
13	0.110	18.1	0.023	13	0.002
14	0.157	19.1	0.274	13.2	0.002
15	0.199	20.1	0.040	14	0.026
16	0.161	21.1	0.019	15	0.049
17	0.112	22.1	0.005	16	0.047
18	0.072	23	0.007	17	0.070
19	0.028	25	0.112	17.3	0.002
20	0.030	26	0.116	18	0.044
21	0.021	27	0.016	18.3	0.002
24	0.002	28	0.007	19	0.082
		29	0.030	19.2	0.009
PIC	0.850	30	0.021	20	0.044
PD	0.964	31	0.023	20.2	0.009
HET	0.902	32	0.026	21	0.035
		33	0.067	21.2	0.019
		34	0.074	22	0.007
		35	0.053	22.2	0.035
		36	0.007	23.2	0.023
		37	0.002	24	0.002
				24.2	0.035
		PIC	0.870	25.2	0.044
		PD	0.971	26.2	0.040
		HET	0.856	27.2	0.084
				28.2	0.084
				29.2	0.051
				30	0.002
				30.2	0.061
				31.2	0.028
				32.2	0.023
				33	0.009
				33.2	0.005
				34	0.002
				36	0.002
				PIC	0.950
				PD	0.990
				HET	0.949

Todos los datos de genética de poblaciones se basan en un estudio realizado por BIOTYPE GmbH con aprox. 210 individuos caucásicos no emparentados.

7. Referencias

Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayr W, Olaisen B (1997) DNA Recommendations. Further report of the DNA commission of the ISFG regarding the use of short tandem repeat systems. *Int J Legal Med* 110:175-176.

Becker D, Vogelsang D, Brabetz W (2007) Population data on the seven short tandem repeat loci D4S2366, D6S474, D14S608, D19S246, D20S480, D21S226 and D22S689 in a German population. *Int J Legal Med* 121:78-81.

Botstein D, White RI, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331.

Hering S, Müller E (2001) New allele and mutational events in D12S391 and D8S1132: sequence data from an eastern German population. *Forensic Sci Int* 124:187-191.

Jones DA (1972) Blood samples: Probability of Discrimination. *J Forensic Sci Soc* 12:355-359.

Nei M, Roychoudhury AK (1974) Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76:379–390.

Szibor R, Edelmann J, Hering S, Plate I, Wittig H, Roewer L, Wiegand P, Cali F, Romano V, Michael M (2003) Cell line DNA typing in forensic genetics – the necessity of reliable standards. *Forensic Sci Int* 138 37-43.

Wiegand P, Lareu M. V., Schürenkamp M (1999) D18S535, D1S1656 and D10S2325: three efficient short tandem repeats for forensic genetics. *Int J Legal Med* 112:360-363.

Wiegand P, Klintschar M (2002) Population genetic data, comparison of the repeat structure and mutation events of two short STRs. *Int J Legal Med* 116:258-261.

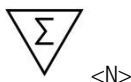
8. Explicación de los símbolos



Fabricante



Código del lote



Suficiente para <N> pruebas



Referencia a elFU



Fecha de caducidad



Límite de temperatura



Número de pedido



Diagnóstico in vitro



Proteger de la luz



Mantener seco

Especificaciones del kit Mentype® Chimera® de amplificación por PCR

A Validación analítica

A a) Determinación de la reacción estándar y de las tolerancias específicas del lote

Objetivo: Determinación de la reacción estándar y de las tolerancias específicas de los lotes en relación con los niveles de señal absolutos (RFU), el equilibrio de los niveles de señal de la PCR múltiple y la línea base.

Metodología: El kit de análisis viene acompañado de un ADN de control, el cual es heterocigótico en la mayoría de sistemas STR. La reacción estándar se ha realizado con el ADN de control en la concentración nominal de 500 pg en determinación cuádruple. Se efectuaron asimismo cuatro valores blancos (sin control patrón, NTC) sin ADN.

Resultados: En el caso de la mezcla por lotes de los cebadores de la PCR, se han establecido las especificaciones siguientes: Utilizando un analizador genético *ABI PRISM® 310* se han establecido niveles de señal de 1 000-4 000 RFU y con un analizador genético *ABI PRISM® 3130* se han establecido niveles de señal de 1 000-5 000 RFU. Las variaciones para niveles de señal de sistemas heterocigóticos no superarán el 30 % del valor de referencia. En el intervalo de escalado no se han detectado señales inespecíficas de ≥ 50 RFU (línea base) para los valores blancos.

A b) Evaluación de la precisión del genotipado

Objetivo: En condiciones estándar se garantiza estadísticamente la precisión de la clasificación de alelos. La evaluación comprueba la nomenclatura de alelos automática o Allele Calling con la escalera alélica y la concordancia de la clasificación de alelos en comparación con la identificación previa del ADN de prueba mediante otros métodos (otros kits de PCR, secuenciación directa, etc.) mediante el software GeneMapper ID. Mediante estos resultados se han establecido los ajustes del equipo específicos del ensayo para el genotipado a través de electroforesis capilar en gel (bins y paneles) y la proporción de picos stutter para los archivos de plantillas de los equipos de secuenciación de ADN.

Metodología: Se han analizado en una sola determinación 80 ADNs identificados previamente de donantes voluntarios procedentes de distintas fuentes (sangre total, pruebas aleatorias). Además, se ha añadido un valor en blanco sin ADN. Como criterios de aceptación se han definido perfiles completos con alturas de picos de ≥ 50 RFU (evaluación manual).

Resultados: Tras determinar los ajustes del equipo específicos del ensayo se ha podido asignar el genotipo correcto a todas las muestras de ADN para todos los sistemas STR y el marcador amelogenina.

A c) Evaluación de la especificidad analítica

Objetivo: El estudio sirve para excluir los resultados falsos positivos derivados de la reactividad cruzada con muestras de ADN no humano seleccionadas. Sin embargo, en la práctica clínica, el ADN no humano puede excluirse en gran medida sobre la base del muestreo estéril.

Metodología: Se han sometido a ensayo 2,5 ng de ADN genómico de *Bos taurus* (bovino), *Sus scrofa domestica* (cerdo doméstico), *Canis lupus familiaris* (perro), *Felis catus* (gato) y *Oryctolagus cuniculus* (conejo doméstico). El ADN de animales procedía de muestras de sangre que se han puesto a disposición como material residual de pruebas veterinarias.

Resultados: No se detectó reactividad cruzada en los intervalos de alelos (< 200 RFU).

A d) Evaluación de la sensibilidad analítica

Objetivo: El ensayo se utiliza para determinar el límite de detección analítica (sensibilidad).

Metodología: Se sometió a ensayo una serie de diluciones de 500 pg hasta 31,5 pg de ADN de referencia en determinación cuádruple. Los perfiles completos de ADN con ≥ 200 RFU se han definido como criterio de aceptación.

Resultados: Se ha establecido un límite de detección de 200 pg de ADN genómico.

A e) Evaluación de distintos termocicladores de PCR

Objetivo: Los termocicladores de PCR de distintos fabricantes son diferentes en sus especificaciones. En particular, pueden existir diferentes rampas de enfriamiento y de calentamiento así como diferentes técnicas de control de la temperatura.

Metodología: El ensayo de las reacciones estándar con ADN de control en la concentración nominal de 500 pg se ha realizado con los siguientes termocicladores en determinaciones cuádruples con la misma mezcla maestra y 2 muestras ciegas sin ADN: Termociclador *GeneAmp 9700* con bloque de aluminio (Life Technologies, Division Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt) además del equipo *GeneAmp 9700* con bloque de plata (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt), termociclador DNA Engine (PTC-200) Peltier (Bio-Rad Laboratories GmbH, München), *Biometra T1* (Biometra GmbH, Göttingen), termociclador *Techne® TC-512* (biostep GmbH, Jahnsdorf) y *Eppendorf Mastercycler ep-S* (Eppendorf AG, Hamburg).

Resultados: No se han detectado subproductos no específicos de ≥ 200 RFU. La desviación de las alturas de pico medias en comparación con la reacción estándar en un incremento definido fue de 2 °C/s, no superior al 20 %.

A f) Evaluación de distintas muestras variadas de ADN

Objetivo: El objetivo del análisis de quimerismo tras el trasplante de células madre alogénicas es la demostración y la cuantificación relativa del ADN del donante y del ADN del receptor. Como prueba de la enfermedad residual mínima, en una muestra compuesta debería llegar a poder detectarse la menor cantidad posible del ADN del donante o del receptor.

Metodología: Se han producido tres mezclas independientes a partir de dos ADNs, donde la proporción menor de ADN era de 0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 30 %, 50 %. Los ADNs en la mezcla mostraban al menos 3 loci STR con cuatro alelos informativos. Cada 1 ng de la mezcla de ADN se ha probado en la reacción estándar en cuatro recipientes por separado. Se han analizado niveles de señal de al menos 50 RFU.

Resultados: Los resultados están representados en la imagen 4. Para el ADN en menor cantidad se ha podido alcanzar un límite de detección del 1 %. Esto se corresponde con los valores 1-5 %, los cuales se logran con kits forenses de STR para el análisis de quimerismo.

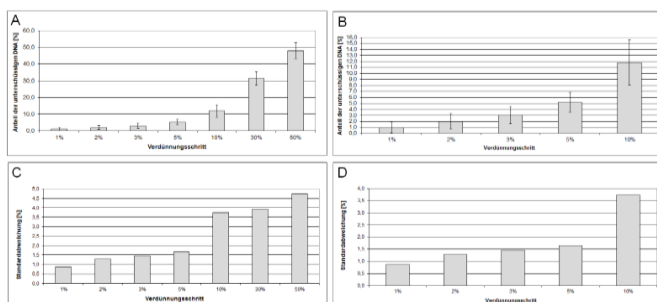


Imagen 4: Análisis de mezclas de ADN. (A, B) Promedios y variación estándar de las proporciones menores de ADN calculadas a partir de los niveles de señal de la electroforesis capilar en gel. (C, D) Variaciones estándar de A y B.

A g) Evaluación del efecto de distintas temperaturas de hibridación en la PCR

Objetivo: Para determinar la solidez de las PCR, se simulan las variaciones de temperatura del paso de depósito de cebadores (annealing o hibridación) de la PCR múltiple. Este paso de temperatura es crítico para la sensibilidad y especificidad de las PCR.

Metodología: La temperatura de hibridación específica del kit de 60 °C de la reacción estándar con ADN de control en la concentración nominal de 500 pg ha variado ± 1 °C y ± 2 °C. Se ha realizado una determinación triple con la misma mezcla maestra.

Resultados: Para $\pm 1^\circ\text{C}$ no se han detectado subproductos no específicos de ≥ 200 RFU. Las alturas del pico promediadas varían en $\pm 1^\circ\text{C}$, máximo $\pm 30\%$ de la reacción estándar. Para $\pm 2^\circ\text{C}$ no se ha detectado fallo de señal < 200 RFU.

A h) Evaluación de distintos lotes de buffer para PCR

Objetivo: Los índices de concentración de los componentes en la solución buffer de la PCR de la mezcla de reacción A (dNTPs, concentraciones de iones, en particular Mg^{2+}) son determinantes para la sensibilidad, la especificidad y el equilibrio de las señales de la PCR múltiple. Por lo tanto, la solidez del ensayo se prueba en función de las variaciones de lotes de la solución buffer facilitada para la PCR.

Metodología: Se han analizado 3 lotes independientes de reacción mixta en la reacción estándar con ADN de control de la concentración nominal de 500 pg.

Resultados: No se han detectado subproductos no específicos de ≥ 50 RFU. La desviación de las alturas de pico medias en comparación con la reacción estándar no ha superado el 20 %.

A i) Análisis de inhibidores de PCR

Objetivo: La hematina de la hemoglobina es un potente inhibidor de la ADN polimerasa *Taq*. En el caso de una purificación insuficiente del ADN, esta no puede retirarse completamente de una sangre total estabilizada.

Metodología: El impacto de *Hematin porcine* (Sigma-Aldrich, Friburgo) fue analizado a concentraciones finales de 0-250 μM en la reacción estándar con ADN de control en la concentración nominal de 500 pg.

Resultados: Los perfiles completos (≥ 50 RFU) se obtuvieron hasta una concentración final de inhibidor de 100 μM de *Hematin porcine*. A partir de una concentración final de 150 μM ya no se pudo alcanzar un perfil completo (subperfiles).

A j) Vida útil desde su apertura

Objetivo: Se ha probado la estabilidad de los reactivos del kit de PCR tras una congelación y descongelación reiteradas.

Metodología: Los reactivos del kit han sido sometidos a 20 ciclos de congelación y descongelación. La congelación se produjo durante al menos 1 h a -20°C . La congelación se produjo a temperatura ambiente y los reactivos fueron homogeneizados agitándolos antes de su uso. A continuación, en tres determinaciones, se realizó una reacción estándar con ADN de control de una concentración nominal de 500 pg y de blancos adicionales sin ADN. La evaluación se produjo comparando una reacción estándar sin ciclo de congelación y descongelación.

Resultados: La desviación de las alturas de pico medias en comparación con la reacción estándar no ha superado el 20 % (especialmente pérdida de la señal). Para los valores en blanco, no se encontraron picos adicionales > 50 RFU dentro de la escala.

B Datos del rendimiento clínico

B a) Muestreo y aspectos éticos y normativos

Se ha llevado a cabo una evaluación del rendimiento con arreglo a los art. 20 a 24 de la Ley alemana sobre productos sanitarios (MPG). El Instituto Federal de Medicamentos y Productos Sanitarios emitió la exención del requisito de autorización para los productos sanitarios de bajo riesgo de conformidad con el art. 7 del Reglamento sobre investigaciones clínicas de productos sanitarios. El comité ético competente adoptó una votación favorable y las declaraciones de los pacientes.

Se utilizó sangre completa venosa heparinizada.

B b) Pruebas comparativas

Como prueba comparativa se utilizó la separación citogenética de los leucocitos de donantes y de receptores mediante la hibridación in situ fluorescente (FISH). Se utilizó el kit de muestras de ADN CE-IVD CEP® X SpectrumOrange™ / Y SpectrumGreen™ para el etiquetado fluorescente directo (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, DE) según las indicaciones del fabricante.

B c) Extracción de ADN y purificación

La extracción de ADN de sangre completa heparinizada se realizó con el kit QIAamp® DNA Blood Mini (Qiagen GmbH, Hilden, DE) según las indicaciones del fabricante.

B d) Resultados

Se recogieron en total 103 conjuntos de datos de pacientes adultos en distintos días tras un trasplante de células madre alogénicas o de médula ósea. Las parejas receptor-donante se distinguen en su sexo genético y, por tanto, son adecuadas para el FISH específico de cromosomas sexuales. Por cada PCR se ha utilizado un mínimo de 1,5 ng de ADN genómico. A continuación, se identificaron todos los sistemas de información STR de las parejas receptor-donante y se confirmó el género mediante el genotipado del marcador amelogenina, el cual es parte integrante de la PCR múltiple. Para la evaluación de la PCR se han utilizado los valores promedio de los niveles de señal de todos los STR informativos (al menos 2). Los resultados de las pruebas comparativas se resumen en la imagen 5.

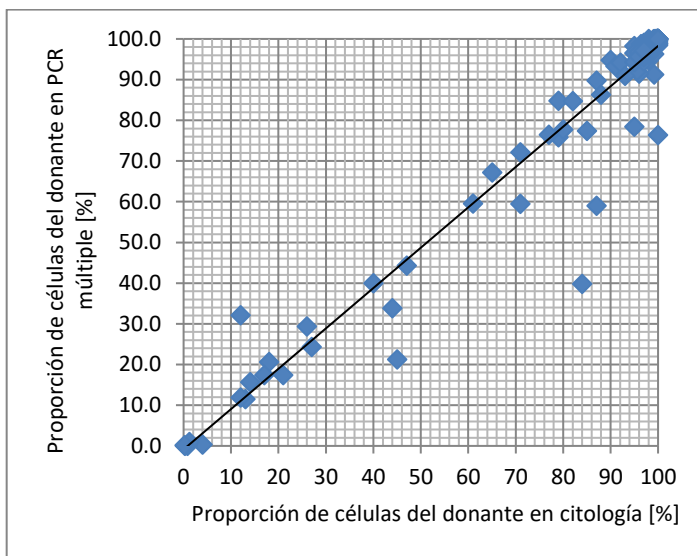


Imagen 5: Análisis de concordancia de la PCR múltiple en comparación con la citología.

En 92 de los 103 conjuntos de datos de medición (90,3 %), la desviación de los hallazgos de la PCR múltiple es menor del 5 % de la citogenética. Se observaron desviaciones importantes solo en relación con los resultados citogenéticos en los que el número total de células contadas era inferior o igual a 500. De acuerdo con las recomendaciones del fabricante del kit FISH, deben contabilizarse al menos 200 células. Con arreglo a las recomendaciones prácticas, los recuentos absolutos superiores de células (500-1 000) obtienen mejores resultados citogenéticos [1, 2].

B e) Referencias

- 1) **Thiede C.** Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. *Am J Pharmacogenomics* 2004; 4: 177-87.
- 2) **Mohr B, Koch R, Thiede C, Kroschinsky F, Ehninger G, Bornhäuser M.** CD34+ cell dose, conditioning regimen and prior chemotherapy: factors with significant impact on the early kinetics of donor chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 949-54.

BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 Dresden

Tel. +49 351 8838 400

Fax +49 351 8838 403

info@biotype.de

www.biotype.de