



Mentype® Chimera®

Dedicato al monitoraggio dello stato di chimerismo

Nota tecnica

Introduzione

La recente indagine EBMT sull'attività di trapianto svolta nel periodo 1990-2010 ha chiaramente indicato l'importanza, costantemente in crescita, del trapianto di cellule staminali ematopoietiche per il trattamento di disordini di natura maligna e non-maligna [1]. Si genera così il bisogno crescente di una diagnostica specificamente dedicata all'indagine del chimerismo post-trapianto.

Mentype® Chimera® è uno dei primi test diagnostici appositamente sviluppati per l'analisi di chimerismo. Il kit consiste in reagenti per una PCR multiplex mirata a 12 marker STR altamente polimorfici, con livello complessivo di eterozigosità estremamente elevato e distribuzione allelica bilanciata. Mentype® Chimera® è stato validato su 203 coppie correlate donatore-ricevente e da allora applicato con successo nella diagnostica di routine.

Qui di seguito viene presentata l'efficacia dell'indagine con marker STR utilizzati in Mentype® Chimera® rispetto a quella con loci genetici compresi in kit STR sviluppati per scopi non legati alla genetica medica umana.

Lavoro sperimentale

Identificazione di marker informativi

E' stata eseguita un'indagine comparativa con Mentype® Chimera® rispetto a un test di PCR multiplex a 16 STR sviluppato a scopo forense. E' stata analizzata la probabilità di identificare costellazioni alleliche informative per analisi chiare di chimerismo. Allo scopo si sono allestite miscele artificiali di DNA donatore/ricevente poi analizzate per loci genici i cui alleli sono separati da almeno 2 unità repeat e i cui segnali sono localizzati al di fuori dell'area dei segnali stutter.

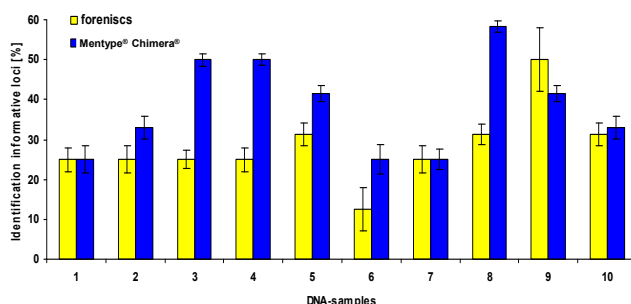


Figura 1. Probabilità di identificare loci informativi; per simulare chimerismo si sono preparate ed analizzate miscele di DNA. Si riporta come percentuale il numero di loci informativi in funzione del numero di marker STR inclusi in entrambi i kit. Le barre d'errore indicano la variazione a seconda che si considerino costellazioni ABCD o ABC. In totale sono state analizzate dieci diverse miscele di DNA.

Risultati e discussione

Mentype® Chimera® mostra chiaramente una più marcata capacità di identificare costellazioni STR informative (Fig. 1). In proporzione al numero di loci monitorati dai diversi kit, Mentype® Chimera® consente di aumentare del 10% la possibilità di identificare costellazioni informative consentendo studi di follow-up certi ed affidabili. I risultati ottenuti concordano con un altro studio comparativo volto a valutare la informatività di marker STR nell'ambito di un'analisi di chimerismo [2]. Lo studio di 203 coppie correlate donatore/ricevente ha consentito una chiara classificazione dei marcatori rispetto al loro valore in un'analisi di chimerismo (Tabella 1). Inoltre, studi recenti hanno corroborato questo scenario. (Tabella 1, loci evidenziati) [3].

I risultati ottenuti mostrano l'importanza di una selezione accurata dei loci STR impiegati in analisi di chimerismo ed illustrano l'efficacia di Mentype® Chimera® nella diagnostica medica.

Tabella 1: Probabilità di identificare costellazioni informative di tipo ABCD in individui correlati da parte di diversi marker STR; modificato da Thiede *et al.*, 2004 [2]. Sono indicati solo i loci investigati in questo studio. I loci evidenziati si riferiscono a Lion *et al.*, 2012 [3] e, se combinati, hanno una probabilità del 99% di identificare alleli ricevente-donatore specifici separati in lunghezza da almeno due repeat.

Forensics		-- Mentype® Chimera®	
inspected loci	chance for "ABCD" constellations [%]	inspected loci	chance for "ABCD" constellations [%]
D2S1338	32,2	D2S1360	22,1
D3S1358	13,6	D3S1744	20
D8S1179	17	D4S2366	20,6
D16S539	16,5	D5S2500	18,1
D19S433	8,7	D7S1517	24,9
D21S11	12,6	D8S1132	23,1
FGA	19,4	D10S2325	24,1
THO1	14,1		
vWA	17		
D12S391	25,4	D12S391	25,4
D18S51	27,7	D18S51	27,7
SE33	45,1	SE33	45,1
Average	20,8		25,1

[1] J.R. Passweg, H. Baldomero, A. Gratwohl, *et al.*: The EBMT activity survey: 1990–2010; Bone Marrow Transplantation (2012), 47, 906-923;

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

[3] T. Lion, F. Watzinger, S. Preuner, *et al.*: The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation; Leukemia (2012) 1-8;



Indagine degli stutter

I cosiddetti "stutter" sono artefatti generati dalla polimerasi la cui occorrenza dipende dalla sequenza dei rispettivi loci STR e dal numero delle unità STR ripetute. Il disegno di primer adeguati e l'attenta selezione dei reagenti consentono di diminuire la frequenza dei picchi stutter grazie a risultati di PCR accurati. La frequenza di stutter in vari kit STR in commercio è riassunta nella Tabella 2.

Risultati e discussione

Mentype® Chimera® presenta una frequenza generale molto bassa di picchi stutter (Tabella 2). Ciò risulta dall'impiego di STR tetra- e penta- nucleotidici, dal disegno dei primer e dalla composizione dei reagenti. Così si riducono errori di scivolamento della polimerasi con conseguente chiarezza dei risultati.

Tabella 2: Frequenza di picchi stutter negli elettroferogrammi di diversi kit. "Stutter category" fa riferimento alla percentuale dell'area del picco stutter rispetto all'area del picco STR.

	Mentype® Chimera®	Promega*	ABI#	Qiagen*
Average stutter [%]	9,8	11,6	12,1	10,3
Standard Deviation	3,2	4,0	3,1	2,7
Stutter Category				
0-10%	6	3	2	4
10-20%	6	11	13	12
> 20%	0	1	0	0

(* , # , x, dati dedotti dai file template dei produttori)

Accuratezza nell'analisi di chimerismo

Per verificare l'accuratezza di Mentype® Chimera® sono state allestite diverse diluizioni non seriali simulanti chimerismo. I campioni artificiali sono stati indagati utilizzando per confronto due kit STR ideati per analisi forense. La sensibilità e l'accuratezza ottenute sono illustrate nella Figura 2.

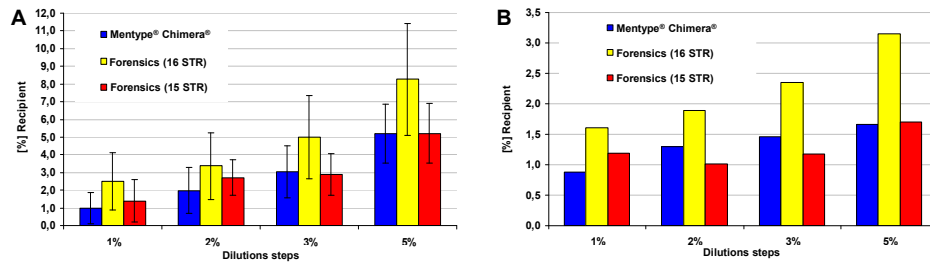


Figura 2: Analisi comparativa di sensibilità ed accuratezza. Per simulare chimerismo vengono allestite tre miscele indipendenti di due DNA (dall'1 % al 5 %; la quantità di DNA utilizzata per la PCR è di 1 ng). Campioni studiati in quattro replicati; A) utilizzo da 1 a 5 % di DNA ricevente corrispondente a 10 – 50 pg di DNA ricevente artificiale e analizzato con elettroforesi capillare. Le barre d'errore indicano la deviazione standard (n=12). B) Deviazioni standard delle misurazioni condotte in A).

Risultati e discussione

Sebbene tutti i kit testati abbiano fornito risultati valutabili in una condizione di chimerismo a bassa percentuale, la qualità delle misurazioni presenta forti differenze. Come illustrato in fig. 2, la maggior accuratezza dei risultati si ottiene con Mentype® Chimera® poiché kit concorrenti hanno sovrastimato la quantità di DNA. Questo studio indica Mentype® Chimera® come ideale per un'analisi accurata ed affidabile, soprattutto con basse % di chimerismo.

Conclusioni

L'attenta selezione di loci short tandem repeat (STR) è essenziale per un'efficace analisi di chimerismo. Il numero di loci informativi dipende più che dal numero totale di marker STR considerati, dalle caratteristiche dei loci impiegati. Una validazione specifica condotta su campioni di pazienti chimerici, inoltre, consente di definire al meglio i reagenti critici in un kit per una performance sicura. Mentype®Chimera® risponde a tutti questi requisiti, è quindi un prodotto standard valido per analisi di chimerismo nella routine clinico-ospedaliera.

Bio type®
Diagnostic GmbH

Mentype® Chimera®	Codice di ordinazione
25 reazioni	45-13210-0025
100 reazioni	45-13210-0100
400 reazioni	45-13210-0400
1000 reazioni	45-13210-1000

Per maggiori informazioni:



Via P. Portaluppi 15 – 20138 Milano
Tel. 02 – 58001.1
Fax. 02 – 58012656
info.astraformedic@ademorigroup.it
www.astraformedic.it