

**“INDICAZIONI TECNICHE” PER LO STUDIO DEL
CHIMERISMO POST-TRAPIANTO DI CSE
ver.1.1 - 2016
a cura del Gruppo di Lavoro per il Chimerismo AIBT**

Partecipanti alla stesura:

Loredana Elia

Benedetta Mazzi

Marcella Margiotta

Marco Andreani

Carla Cervelli

Coordinatore:

Franco Papola

Sommario

Sommario	2
1. Requisiti strutturali	4
2. Fase pre-analitica	4
2.1. Analisi pre-trapianto	5
2.2. Monitoraggio post-trapianto	6
2.3. Frequenza campionamenti nell'analisi del follow-up	7
2.4. Caratteristiche dei campioni	7
• Tipo di Anticoagulante.....	7
• Volume dei campioni.....	7
• Temperatura di conservazione e trasporto.....	7
• Tempo dal prelievo al processamento	8
• Separazione di linee cellulari specifiche	8
3. Fase analitica.....	8
3.1. Estrazione e valutazione di DNA	8
3.2. Reazione di PCR.....	9
3.2.1. Studio degli STRs (<i>Short Tandem Repeats</i>) mediante multiplex-PCR	9
3.2.2. Q-PCR.....	10
4. Fase post-analitica	10
4.1. Refertazione	10
4.1.1. Referto.....	10
4.1.2. Tempi di Refertazione.....	11
4.1.3. Conservazione dei dati.....	11
5. Allegato n°1.....	11
5.1. Studio degli STRs: principio della metodica	11
5.2. Studio degli STRs: materiali	12
5.3. Studio degli STRs: standardizzazione intra-laboratorio.....	13
5.4. Studio degli STRs: analisi ed interpretazione dei dati	14
• Genotipizzazione: analisi mediante Gene Mapper.....	14
• Valutazione degli RFU	17
• Valutazione dei controlli positivo e negativo	17

•	Identificazione dei loci informativi.....	18
•	Valutazione semiquantitativa del chimerismo (%R e %D)	19
•	Combinazioni alleliche	20
5.5.	Problematiche nell'interpretazione dei dati.....	23
•	Problemi tecnici	23
•	Problemi biologici	23
•	Low copy number DNA	26
•	Eccesso di DNA	27
•	DNA degradato.....	29
6.	Allegato n°2	
6.1.	Studio del chimerismo mediante Q-PCR: principio della metodica	
6.2.	Studio del chimerismo mediante Q-PCR: materiali	
6.3.	Studio del chimerismo mediante Q-PCR: standardizzazione/validazione intra-laboratorio	
6.4.	Studio del chimerismo mediante Q-PCR: analisi ed interpretazione dei dati	
7.	Bibliografia	

1. Requisiti strutturali

Per l'esecuzione dei test di biologia molecolare, occorre attenersi agli Standards dei Programmi di Accredimento tipo EFI (European Federation for Immunogenetics) o ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunigenetics) secondo i quali i laboratori devono possedere i requisiti minimi strutturali stabiliti dal D.P.R. 14/1/1997 e quindi essere dotati di aree adeguate per eseguire le seguenti procedure:

- accettazione del materiale biologico quale, sangue periferico e/o midollare, saliva, liquor, swab buccale, capelli, frammenti tessutali o altro materiale;
- acquisizione e conservazione dei dati relativi ai campioni da analizzare, alle procedure attuate e ai referti, all'archiviazione e alla rintracciabilità tenendo in considerazione le norme vigenti per la protezione dei dati personali. Vanno, inoltre, conservate le documentazioni relative alla manutenzione ordinaria, preventiva e straordinaria della strumentazione, i controlli periodici delle temperature nel rispetto degli standards operativi;
- le certificazioni riguardanti la formazione del personale in servizio e di quello in addestramento con l'adempimento della normativa vigente in tema di Educazione Continua in Medicina (ECM);
- zone separate di pre- e post-PCR ove eseguire: nella pre-PCR estrazione del DNA e allestimento delle reazioni di PCR, mentre nella post-PCR il completamento delle analisi dei prodotti di amplificazione.

2. Fase pre-analitica

Al fine di garantire il corretto processamento dei campioni, il materiale biologico che arriva in laboratorio deve essere prelevato e conservato in modo da mantenerne l'integrità e la sterilità, se pertinente. Secondo le norme di accreditamento, per

ridurre al minimo la possibilità di scambi tra campioni, le provette/contenitori contenenti materiale biologico devono pervenire al laboratorio provviste di etichette recanti la data del prelievo, il cognome il nome del paziente, la data di nascita e l'eventuale codice interno della struttura ospedaliera. Inoltre, il campione deve essere accompagnato da una richiesta scritta/elettronica sulla quale il richiedente deve indicare: nome e cognome del paziente, data di nascita, sesso, data del prelievo, tipo di campione prelevato, tipo di esame richiesto se si tratta di un'analisi pre-trapianto o di un monitoraggio post-trapianto, nome e recapito del clinico referente. Ad ogni campione pervenuto si deve attribuire un codice interno del laboratorio preferibilmente attraverso un barcode.

Seguendo queste indicazioni di base, è necessario considerare che quando si effettua uno studio di valutazione del chimerismo, le informazioni richieste possono essere diverse se si parla di un'analisi pre-trapianto o di un monitoraggio post-trapianto.

2.1. Analisi pre-trapianto

- Informazioni sul ricevente: cognome, nome, data di nascita, sesso, codice struttura di provenienza, diagnosi ed informazioni cliniche (cariotipo, eventuali riarrangiamenti genici, SNPs, etc.), stato di malattia al trapianto (remissione o malattia attiva), informazioni relative alla valutazione della malattia minima residua (MMR).
- Informazioni sul donatore/i: cognome, nome, data nascita, sesso, donatore correlato o non correlato, codice MUD/CORD, sorgente CSE (CSEp, CSEm, CORD singolo/multipli).
- Informazioni sul trapianto: data, trapianto singolo/multiplo (autologo post-allogeneico, allogeneico, allogeneico da stesso donatore, allogeneico da donatore diverso), aploidentico, tipo di condizionamento (mieloablativo, a ridotta intensità = RIC, etc.).
- Campione del ricevente pre-trapianto: nell'ambito dello studio del chimerismo con metodiche molecolari, al fine di identificare la genotipizzazione del ricevente pre-trapianto si può utilizzare sangue fresco midollare o periferico (in questo caso va considerato il dato dell'emocromo con la conta dei leucociti), sangue congelato, saliva, tampone buccale, campione di DNA. In assenza di un campione idoneo pre-trapianto, può essere utilizzato un tampone buccale post-trapianto anche se non è considerato il

campione ideale data la possibile contaminazione con cellule del donatore. Il genotipo del ricevente può essere dedotto, in tal caso, da parte di personale con notevole esperienza, dal campione buccale post trapianto, chimerico, se sono noti gli alleli del donatore.

- Campione del donatore: nell'ambito dello studio del chimerismo con metodiche molecolari, al fine di identificare la genotipizzazione del donatore si può utilizzare sangue fresco o congelato, midollare o più frequentemente periferico (in questo caso considerare il dato dell'emocromo con la conta dei leucociti), saliva, tampone buccale etc. o direttamente DNA proveniente da altri centri di reclutamento dei donatori. In assenza di un campione idoneo, il genotipo del donatore può essere anche dedotto, da personale con notevole esperienza, da campioni chimerici del ricevente post-trapianto sottraendolo alla genotipizzazione del ricevente pre-trapianto, anche se questa non è da considerarsi la situazione ideale!

2.2. Monitoraggio post-trapianto:

- Informazioni sul ricevente: cognome, nome, data di nascita, sesso, codice struttura di provenienza, data del trapianto.
- Informazioni sul donatore/i: codice MUD/CORD o cognome, nome, data di nascita, sesso, struttura di provenienza, correlato o non correlato, aploidentico, mismatched per HLA.
- Campione post-trapianto: data e ora del prelievo (specialmente nel caso in cui si proceda alla separazione di sottopopolazioni cellulari), valori relativi all'emocromo con conta dei leucociti, informazioni sulla determinazione del chimerismo su campione intero e/o linea cellulare, motivazioni della richiesta se da protocollo o per eventuale sospetto diagnostico, recenti manovre cliniche subite dal paziente e relative date (es. DLI, boost, etc.), 1° trapianto o trapianto successivo (in questo caso con riferimento al/ai donatori precedenti), informazioni sullo stato della MMR e grado di urgenza del test.
- Il materiale più utilizzato per il monitoraggio longitudinale è il sangue midollare (intero e/o sottopopolazioni cellulari) in associazione al sangue periferico (intero e/o sottopopolazioni cellulari). Seguendo i suggerimenti provenienti dalla letteratura corrente è sconsigliabile l'uso del solo sangue periferico soprattutto per alcuni tipi di patologie leucemiche (Leucemie Acute Linfoidi, Leucemie Acute Mieloidi, Leucemie Linfoidi Croniche, Mielomi

Multipli, Mielodisplasie, Aplasie Midollari); in alcune circostanze potrebbero essere utilizzati anche liquor, biopsie tissutali, ecc. E' comunque consigliabile usare sempre lo stesso materiale biologico di partenza per la valutazione dell'andamento longitudinale del chimerismo durante il follow-up.

2.3. Frequenza campionamenti nell'analisi del follow-up:

La tempistica dei prelievi segue le regole dettate dai protocolli nazionali o internazionali a cui aderiscono i Centri Trapianto o gli schemi concordati nell'HSCT agreement in funzione della patologia. In generale i timepoints considerati sono gg+20/30 (per definire lo stato di attecchimento), gg+60 (fondamentale se non ci sono altri marcatori molecolari di malattia), gg+90/100 (per confermare l'attecchimento); successivamente i tempi sono variabili, possono essere legati alla valutazione della sospensione dell'immunosoppressore o al sospetto di eventuale ripresa di malattia oppure alla programmazione di interventi terapeutici quali il DLI e comunque a discrezione del clinico che li richiede.

2.4. Caratteristiche dei campioni

- Tipo di Anticoagulante:

Per il sangue periferico o midollare è preferibile EDTA, ma si può usare anche il sodio-citrato mentre è assolutamente sconsigliabile l'utilizzo dell'eparina in quanto interferisce con l'attività degli enzimi utilizzati nelle reazioni di amplificazione. Per gli altri materiali biologici (saliva, tampone buccale, capelli, sudore, liquor, frammenti tissutali, etc.), far riferimento al protocollo operativo del laboratorio per estrarre DNA da un numero sufficiente di cellule.

- Volume dei campioni:

Normalmente sono preferibili campioni contenenti da 1 a 4 ml di sangue periferico o midollare; sono invece necessari 20 ml quando è richiesta la separazione di sottopopolazioni cellulari, così da garantire una quantità di DNA sufficiente all'analisi sia pre-trapianto che di monitoraggio post-trapianto.

- Temperatura di conservazione e trasporto:

La temperatura ideale di conservazione e trasporto è tra 18-22°C, in particolare è consigliabile temperatura ambiente soprattutto per la separazione di sottopopolazioni cellulari al fine del mantenimento dell'espressione degli antigeni

cellulari di superficie. Evitare temperature superiori a 25°C. I campioni possono essere congelati a -20°C. Il DNA una volta estratto può essere conservato a + 4°C per anni.

- Tempo dal prelievo al processamento:

Il DNA dovrebbe essere estratto il più presto possibile per evitare la degradazione del campione stesso: idealmente entro 24 ore dal prelievo, al massimo entro 72 ore; campioni in anticoagulante diverso da EDTA vanno processati entro 24 ore. I campioni possono essere congelati a -20°C e si può estrarre il DNA quando è più conveniente all'organizzazione del laboratorio. Nel caso in cui l'estrazione del DNA sia preceduta dalla separazione di linee cellulari specifiche, quest'ultima dovrebbe essere eseguita il prima possibile per ottenere il massimo della purezza in quanto i marcatori di superficie possono degradarsi.

- Separazione di linee cellulari specifiche:

Se si procede alla separazione delle diverse linee cellulari specifiche, secondo lo schema concordato nell'HSCT agreement in funzione della patologia e dei protocolli nazionali ed internazionali, occorre definire il metodo utilizzato per la separazione: Magnetic-Activated Cell Separation manuale/automatica (MACS) oppure Fluorescence-Activated Cell Separation (FACS). Per ogni linea cellulare specifica separata, valutare, se possibile, la purezza mediante citometria a flusso e indicarla nel referto finale. Qualora la quantità di cellule fosse un fattore limitante, la valutazione della purezza può essere omessa, ma questo dovrebbe essere indicato nel referto finale.

3. Fase analitica

3.1. Estrazione e valutazione di DNA

- Metodo di estrazione: il metodo di estrazione deve permettere di ottenere DNA in quantità e qualità idonea e sufficiente per la preparazione della reazione di PCR. Attualmente sono in uso diversi metodi sia manuali che automatizzati che consentono l'ottenimento di DNA di buona qualità e concentrazione.
- Metodo di valutazione qualitativa e quantitativa del DNA. Qualunque sia il metodo di estrazione del DNA, valutare tramite spettrofotometria e/o fluorimetria la quantità e la qualità del DNA, rispettando i criteri accettati e

standardizzati dal laboratorio. Qualora la quantità/qualità del DNA non fosse ottimale, tentare di ripetere l'estrazione su altro materiale e in caso di ulteriore fallimento o di ottenimento di scarsa quantità, tale da compromettere la qualità degli RFU nell'analisi con STR o la qualità del gene di controllo nella Q-PCR, indicarlo nel referto finale. Se si sospetta una degradazione del DNA, si può valutare la qualità dell'acido nucleico mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio.

3.2. Reazione di PCR

Durante il monitoraggio dell'attecchimento emopoietico post trapianto, lo studio del chimerismo fornisce informazioni fondamentali sulla cinetica dell'attecchimento e rappresenta l'unico metodo di monitoraggio molecolare per quei pazienti privi di alterazioni geniche specifiche della malattia identificate alla diagnosi. Lo studio del chimerismo post trapianto può essere eseguito tramite due metodiche diverse: lo studio degli *STRs* (*Short Tandem Repeats*) mediante una multiplex-PCR e lo studio di marcatori polimorfici biallelici di inserzione/delezione (Ins/Del) mediante la Real Time Quantitative PCR (Q-PCR). Per queste metodiche esistono diversi kit commerciali, molti dei quali come nel caso degli STR sono stati standardizzati per l'uso in medicina forense, laddove le quantità di DNA a disposizione spesso sono veramente minime (1-2 ng di DNA). Nel caso dell'applicazione di questi kit agli studi clinici, come nel caso dello studio del chimerismo, la quantità di materiale di cui si dispone è quasi sempre considerevole. Studi internazionali **(1)** dimostrano come al di sotto dei 10 ng di DNA, corrispondenti a circa 1500 cellule di partenza, la riproducibilità del dato diventa discutibile, mentre risulta accettabile se si considerano >25 ng di DNA per reazione. Queste valutazioni sono generiche e possono variare in considerazione della metodica che si va ad approntare (*STR* o *Q-PCR*), ma per assicurare la riproducibilità del dato in termini di specificità ed accuratezza occorre stabilire internamente ad ogni laboratorio il range ottimale di qualità del DNA (260/280 nm > 1,8) e di quantità (10-250 ng) approntando un esperimento di diluizione del DNA a concentrazioni scalari e determinando quindi la quantità più adeguata da utilizzare a seconda della metodica utilizzata.

3.2.1. Studio degli STRs (*Short Tandem Repeats*) mediante multiplex-PCR

STR è l'acronimo di Short Tandem Repeats si tratta di microsatelliti costituiti dalla successione di un certo numero di sequenze ripetute. Differiscono dai minisatelliti

VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) perché sono molto più corti, ogni *repeat* è estremamente semplice essendo costituito da 2-5 paia di basi. Gli *STRs* risultano particolarmente informativi ed utili sia nelle applicazioni di genetica forense che per gli studi clinici. La loro ampia distribuzione all'interno del genoma umano consente di studiare il chimerismo tra paziente e donatore anche in presenza di riarrangiamenti cromosomici o perdite di informazione genetica (monosomie o delezioni), che sono in genere frequenti nelle leucemie o nei disordini ematologici. Tali sequenze sono trasmesse alla discendenza secondo le leggi mendeliane, sono localizzate in regioni non codificate del DNA e quindi non sono soggette alla selezione naturale; inoltre, presentano una forte variabilità, mostrando una chiara eterozigotà nei soggetti. Il principio, i dettagli metodologici e l'interpretazione dei dati sarà affrontata nell'Allegato 1.

3.2.2. Studio del chimerismo mediante Q-PCR

Q-PCR è l'acronimo di Quantitative PCR mediante Real Time-PCR, in cui la quantità dei prodotti di PCR è misurata ad ogni ciclo di reazione grazie all'uso di molecole fluorescenti. Questa capacità di monitorare la reazione durante la sua fase esponenziale permette di determinare la quantità di DNA target iniziale con molta precisione. L'applicazione della Real Time-PCR alle analisi di chimerismo deriva dall'esperienza fatta su studi di espressione genica di cui ha mantenuto la struttura base del saggio, adattandola però alle nuove esigenze analitiche. L'analisi di chimerismo mediante Real Time-PCR e tecnologia TaqMan utilizza marcatori polimorfici biallelici di inserzione/delezione (Ins/Del) distribuiti su diversi cromosomi, presentando una discreta variabilità nei soggetti.

Il principio, i dettagli metodologici e l'interpretazione dei dati sarà affrontata nell'Allegato 2.

4. Fase post-analitica

4.1. Refertazione

4.1.1. Referto

Nel referto è opportuno riportare:

- nome, cognome e data di nascita del paziente;
- data del prelievo;

- tipo di materiale biologico analizzato: sangue periferico, sangue midollare, saliva, prelievo tissutale, capelli, liquor, sottopopolazioni linfocitarie, etc. In quest'ultimo caso indicarne la relativa percentuale ottenuta, il metodo utilizzato per la separazione stessa e la purezza valutata mediante citometria a flusso (se possibile). Qualora la quantità di cellule fosse un fattore limitante, non si eseguirà la valutazione della purezza e questo dato andrà riportato nel referto finale;
- data del trapianto di CSE o i giorni del *follow-up* post-trapianto corrispondenti alla data di arrivo del campione;
- tipo di metodica utilizzata con la relativa sensibilità raggiunta;
- qualità del campione studiato, se ipocellulare, se coagulato, se arrivato al di fuori dei tempi stabiliti;
- il risultato del monitoraggio post-trapianto dovrebbe esser riportato come segue: tra 0-10% risultato con 1 decimale, >10% risultato come numero intero. Nel *setting* di donatori multipli, si raccomanda di riportare la percentuale di chimerismo individualmente per ogni donatore.

4.1.2 Tempi di Refertazione.

Si raccomanda di definire il tempo di refertazione delle analisi di chimerismo, in routine ed in urgenza: si suggerisce entro 5 giorni lavorativi dalla ricezione del campione in routine, mentre se si tratta di un campione urgente entro 3 giorni lavorativi.

4.1.3. Conservazione dei dati

I documenti cartacei ed informatici di ciascun paziente devono contenere un codice campione unico e/o l'identificativo del soggetto (cognome, nome e data di nascita). Nei piani di lavoro devono essere registrate le informazioni relative alle analisi svolte. La documentazione delle procedure di analisi deve essere archiviata secondo le norme vigenti.

5. Allegato n°1

5.1. Studio degli STRs: principio della metodica

L'amplificazione dei microsatelliti viene eseguita mediante una *multiplex PCR*, in cui i vari STRs vengono amplificati contemporaneamente mediante l'aggiunta alla miscela di reazione di una coppia di *primers* specifica per ciascun STR da amplificare **(2),(3)**. Tali *primers* sono marcati con fluorocromi per permetterne la

discriminazione e hanno temperature di *annealing* molto simili. Il processo di acquisizione dei dati dell'elettroforesi capillare, eseguita mediante l'uso di un sequenziatore, permette solo di visualizzare gli alleli sotto forma di picchi di un elettroferogramma. L'informazione contenuta nei vari picchi deve essere convertita in profilo genetico (genotipizzazione), vale a dire che ad ogni locus presente in un campione deve essere assegnato un allele (in caso di omozigosi) o gli alleli (in caso di eterozigosi), identificati con una serie di numeri che indicano il numero di ripetizioni in tandem della sequenza "core" presenti. La conversione dell'elettroferogramma in profilo genico viene effettuata mediante il *software Gene Mapper*.

5.2. Studio degli STRs: materiali

L'approccio allo studio degli STRs richiede:

- l'utilizzo di kit commerciali, distribuiti anche in Italia e molto spesso impiegati in genetica forense, basati su una *multiplex-PCR*;
- l'uso di un termociclatore per eseguire la multiplex-PCR (programma termico). Alcuni kit commerciali per lo studio degli STRs hanno delle preferenze sulla strumentazione da utilizzare. In ogni caso il termociclatore utilizzato deve seguire un programma di manutenzione periodica come indicato dalla ditta costruttrice e/o dagli utilizzatori. Si consiglia di utilizzare il profilo di amplificazione come indicato dalla relativa metodica;
- l'impiego di un sequenziatore per l'elettroforesi capillare. La componente analitica dell'elettroforesi capillare, l'appropriato controllo dei fluorocromi utilizzati, l'impostazione e la calibrazione spaziale dell'analizzatore utilizzato, nonché l'uso del *software* interpretativo delle corse elettroforetiche devono essere affidate a personale esperto.

A) Assicurarsi che il sequenziatore abbia eseguito una corretta **calibrazione spettrale** almeno una volta all'anno, cioè che ci sia una buona matrice con cui analizzare i campioni. Si deve considerare che le matrici fornite dalle ditte produttrici dei kit per STRs in commercio hanno una scadenza che di solito è annuale.

B) Si consiglia la sostituzione dei capillari del sequenziatore ogni 250-300 corse eseguite. Quando vengono sostituiti i capillari, occorrerà ripetere la **calibrazione spaziale**, che consente di mappare la posizione di ciascun

capillare sulla CCD camera dello strumento. Per fare questo esistono programmi dedicati, forniti con i sequenziatori, che guidano in maniera precisa le manovre da eseguire.

C) Si consiglia la sostituzione dei tamponi di corsa al massimo ogni 7 giorni. Questo dato può variare in relazione al numero di corse effettuate, se vengono eseguite molte corse al giorno i tempi andranno ridotti fino a 3-4 giorni;

- *software* di analisi dei dati.

5.3. Studio degli *STRs*: standardizzazione intra-laboratorio

Al fine di ottenere un elevato grado di sensibilità e di specificità è bene che all'interno di ciascun laboratorio vengano presi in esame i vari punti della metodica definendo una standardizzazione a livello tecnico in termini di riproducibilità e sensibilità **(6), (7)**.

- E' di fondamentale importanza valutare la **quantità** e la **qualità** del **DNA** estratto da campioni ematici o da sospensioni cellulari (sangue periferico, sangue midollare, sottopopolazioni linfocitarie). Dopo aver stabilito il kit commerciale da utilizzare, è consigliabile eseguire delle diluizioni seriali di un campione di DNA di ottima qualità, partendo da 10 ng fino a 0,25 ng e su queste diluizioni allestire uno studio degli *STRs*, al fine di stabilire la concentrazione ottimale di DNA tale da consentire l'analisi di tutti i frammenti che dovranno avere un'altezza dei picchi di fluorescenza in un *range* compreso tra 500-4000 RFU (*Relative Fluorescence Unit*). Sarebbe opportuno effettuare questa valutazione su un certo numero di campioni (10-20) e stabilire quindi la concentrazione ottimale di DNA da utilizzare in ogni esperimento. Nel caso di DNA estratto da sospensioni di sottopopolazioni linfocitarie, solitamente la quantità minima di cellule da considerare è circa 1500/μL ma molto dipende dalla tipologia di estrazione di DNA genomico impiegata.
- Con lo scopo di valutare la **riproducibilità** dei dati è opportuno allestire un saggio di riproducibilità *intra-assay* ed *inter-assay*. La riproducibilità *intra-assay* può essere controllata analizzando in doppio alcuni campioni e valutando il frammento di 250 bp del *size standard*, usato come controllo

interno. Il tempo di separazione elettroforetica di questo frammento, se i parametri tecnici dell'elettroforesi sono idonei, deve risultare simile in tutti i campioni analizzati, con una variazione massima del 4-5%. La riproducibilità *inter-assay* si può controllare analizzando gli stessi campioni in sedute analitiche diverse. La rivalutazione dei campioni dovrebbe riportare una variazione dell'area dei picchi inferiore al 3%, conforme a quanto riportato in letteratura. Allo scopo di controllare costantemente la variabilità *inter-assay*, nella stessa seduta analitica, si può anche valutare un nuovo campione post-trapianto (TMO) con quello precedente già testato dello stesso paziente e verificare che la rivalutazione del precedente campione abbia una riproducibilità interpretativa del 98-100 %.

- Per definire la **sensibilità** della metodica in uso si può simulare uno stato chimerico tra i campioni ematici di due soggetti, uno di sesso femminile (R) ed uno di sesso maschile (D). Si cercheranno 2 campioni nei quali la concentrazione dei leucociti sia simile. Si allestiscono 5 o più miscele a % nota, da ogni miscela si estrae il DNA e si amplifica la quantità ottimale stabilita dal laboratorio. Il test verrà ripetuto per 4-5 volte e l'analisi quantitativa dell'area dei picchi degli alleli dei frammenti valutabili verrà espressa come % di cellule del donatore (D) presenti nel campione analizzato. La sensibilità del dosaggio di STR potrebbe non corrispondere a quella dichiarata dalla ditta produttrice.

5.4. Studio degli STRs: analisi ed interpretazione dei dati

- **Genotipizzazione: analisi mediante Gene Mapper**

Nel corso degli anni, sono stati sviluppati diversi *software* che consentono di assegnare al DNA analizzato un determinato genotipo. *Software*, quali *Gene Scan*, *Genotyper*, e più recentemente da *Gene Mapper*, sono in grado di convertire il dato grezzo in un profilo genetico. L'identificazione del preciso assetto genetico viene affidata all'esperienza dell'operatore. Ogni laboratorio dovrà acquisire esperienza con la qualità del DNA in esame, talvolta degradato o di scarsa qualità e quantità, con la strumentazione e con i programmi di analisi, infine con le situazioni di profili misti in cui compaiono molteplici donatori su un ricevente che possono mettere in difficoltà l'interpretazione del dato.

L'analisi dell'elettroferesi capillare, effettuata mediante il *software Gene Mapper*, visualizza i risultati sotto forma di elettroferogramma con in ascissa le paia di basi (bp) ed in ordinata l'unità di fluorescenza relativa (RFU = Relative Fluorescent Unit) (**Figura 1**). Il dato in uscita è quindi rappresentato da una serie di picchi, gli alleli, ciascuno dei quali corrisponde ad un frammento di lunghezza diversa. Nell'elaborazione del profilo genetico, il *software*, definisce per ogni campione analizzato:

- l'assegnazione della taglia. Ad ogni corsa viene utilizzato uno standard di lunghezza interno marcato con un fluorocromo diverso costituito da frammenti di DNA di lunghezza nota; viene così costruita una curva di calibrazione in cui si mette a confronto la lunghezza nota dei frammenti dello standard con il loro tempo di migrazione e questa curva verrà utilizzata quindi per assegnare ai diversi picchi in analisi una taglia specifica (**Figura 2**).
- l'assegnazione degli alleli. Al fine di identificare il genotipo del campione in esame e quindi gli alleli corrispondenti, viene utilizzato ad ogni corsa un marcatore allelico, *allelic ladder* (AL), formato da una miscela di alleli di lunghezza nota, che correla la taglia del prodotto di amplificazione con il numero di ripetizioni da cui è formato (**Figura 1**).

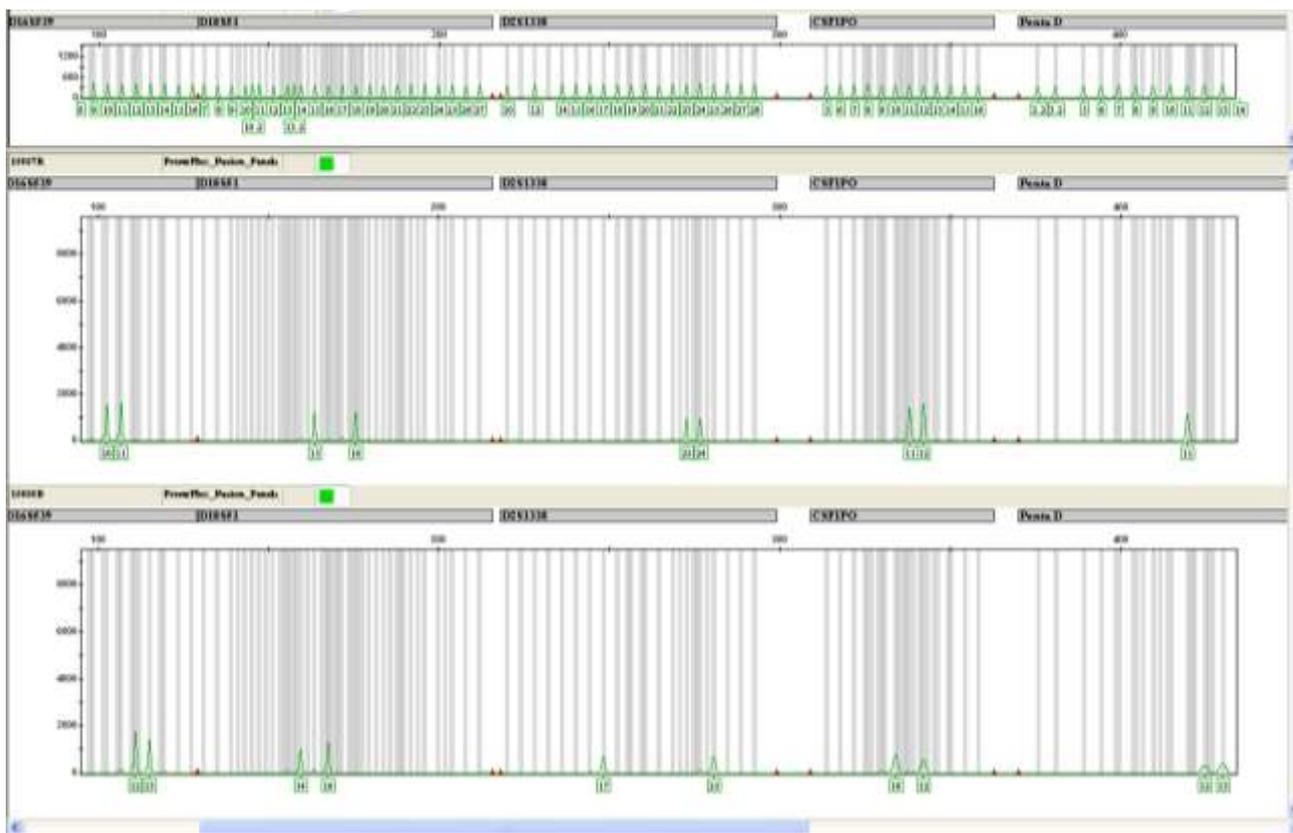


Figura 1. Esempio della schermata del *software Gene Mapper*: in alto il profilo dell'*allelic ladder* (AL) e di seguito il profilo di due campioni in esame in cui sono evidenti gli alleli corrispondenti ai loci analizzati.

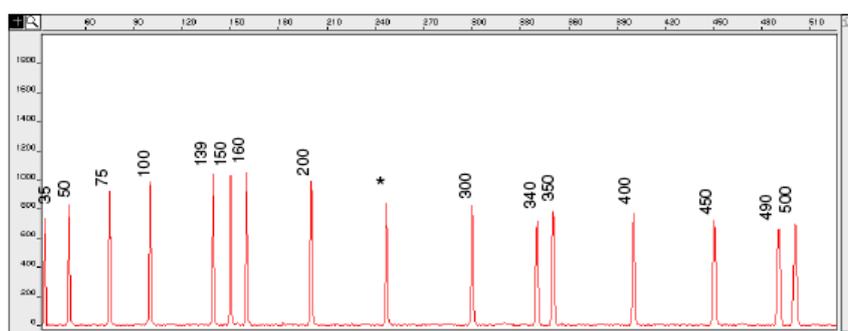


Figura 2. Esempio di corsa di standard di lunghezza interno (LIZ).

- **Valutazione degli RFU**

Il *range* comunemente considerato accettabile è compreso tra 500-4000 RFU.

- **Valutazione dei controlli positivo e negativo**

Seguendo le istruzioni dei kit attualmente in commercio per lo studio degli *STRs*, sono sempre previsti un controllo positivo fornito dal kit con gli alleli noti per i diversi loci che ovviamente devono corrispondere perfettamente con lo studio in esame, ed un controllo negativo ossia la mix con tutti i componenti escluso il DNA sostituito da acqua nuclease free.

• **Identificazione dei loci informativi**

L'identificazione dei loci informativi viene eseguita su campioni di R e D pre-trapianto. Nella pratica corrente si definisce **locus informativo** un locus in cui **non** si evidenzia alcuna condivisione allelica tra Donatore (D) e Ricevente (R) (**Figura 3**).

LOCUS	Amelogenina	D3S1358	D1S1656	D2S441	D10S1248	D13S317	PENTA E
R	X-Y	16-18	14-16.3	11-11.3	13-13	9-11	7-13
D	X-Y	14-16	12-16	11-14	17-17	8-12	11-12

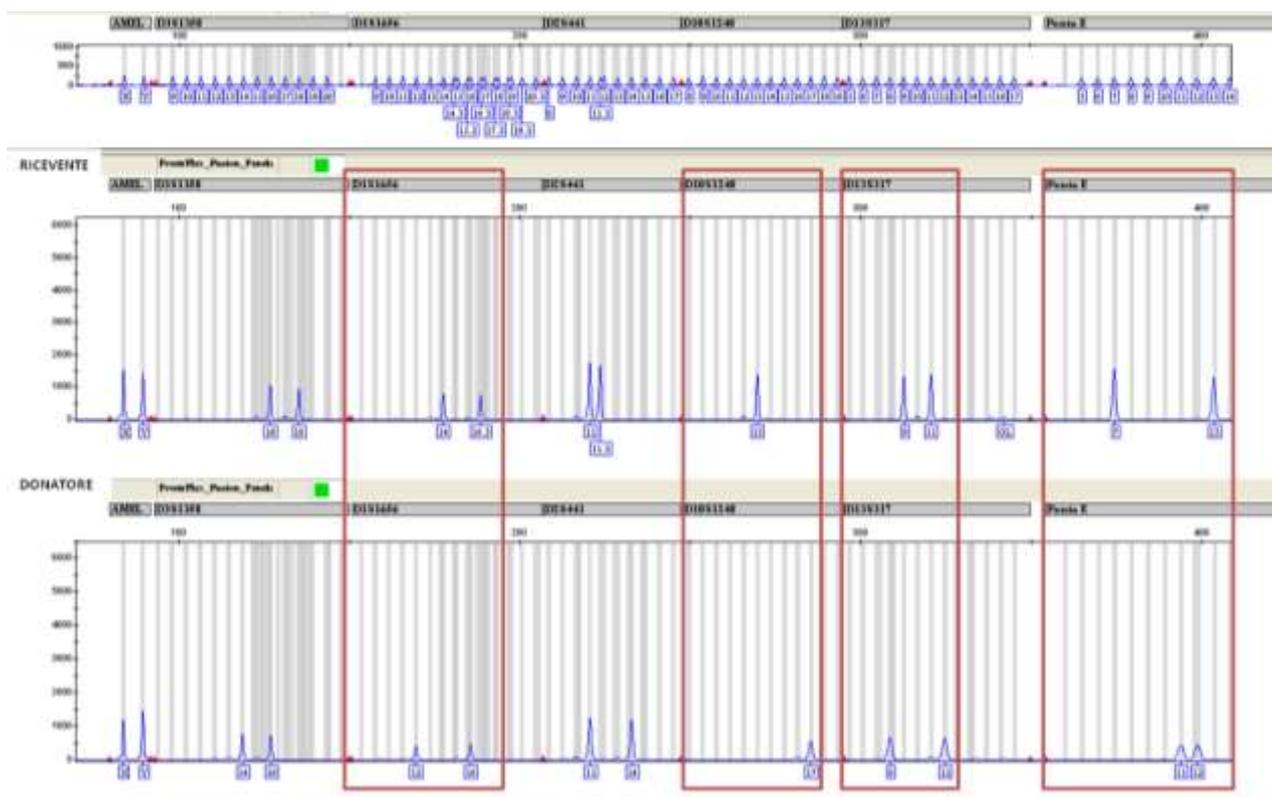


Figura 3: In alto è rappresentato il pannello di base tra Donatore (D) e Ricevente (R) con i loci informativi evidenziati in rosso (D1S1656, D10S1248, D13S317, PENTA E); la figura in basso mostra l'elettroferogramma di base in cui si evidenzia il profilo dell'AL (in alto), a seguire il profilo del Ricevente ed in basso quello del Donatore con i loci informativi cerchiati in rosso. Si osserva come i loci considerati informativi non abbiano alleli condivisi tra R e D.

Per la scelta dei loci informativi da analizzare durante il monitoraggio tra D e R occorrerà fare una distinzione tra le diverse categorie di donatori, se “Non Correlati” (MUD, SCO) o “Familiari”(Aploidentico e Sibling): nel caso in cui il donatore sia “Non Correlato” sarà più frequente trovare dei loci con differenze tra D e R e si cercherà di scegliere come loci informativi solo quei loci in cui non vi sarà nessuna condivisione allelica. Il numero minimo dei loci informativi da considerare nella valutazione è di almeno due e in questo caso si raccomanda di confrontare il valore % di chimerismo anche con quello ottenuto dagli altri loci, quelli cioè che presentano un allele condiviso eseguendo i calcoli dopo aver escluso l’area dell’allele condiviso (vedi paragrafo “Quantificazione con formula”). In linea generale, anche in presenza di più di due alleli informativi è sempre consigliabile controllare l’intero profilo genetico, per rendersi conto dell’andamento generale. Nel caso di trapianti da donatori familiari, se ci trovassimo ad avere un solo locus informativo tra D e R, sarebbe auspicabile poter ampliare il numero dei loci utilizzando per esempio un kit alternativo da tenere sempre a disposizione in laboratorio, qualora sia possibile. Per la scelta dei marcatori bisogna anche considerare che i marcatori possono essere soggetti a perdite cromosomiche, costituzionali o acquisite, come nel caso della sindrome di Down ed altre trisomie oppure la perdita dei cromosomi 5 e 7 nelle sindromi mielodisplastiche.

- **Valutazione semiquantitativa del chimerismo (%R e %D)**

L’analisi del chimerismo post-trapianto viene eseguita attraverso l’analisi dell’area dei picchi relativa a quei loci identificati come informativi, ottenendo un valore semiquantitativo del chimerismo espresso come % di D e/o di R.

A partire dall’area del picco viene stimata la percentuale di chimerismo sulla base della seguente formula:

$$\%D = \frac{D1 + D2}{D1 + D2 + R1 + R2} \times 100$$

dove D1 e D2 sono le aree degli alleli del donatore, mentre R1 e R2 quelle del ricevente (4).

- **Combinazioni alleliche**

Nell'analisi del chimerismo possono essere identificati tre differenti tipi di loci (Figura 4):

- **Loci di tipo I.**
- **Loci di tipo II.**
- **Loci di tipo III.**

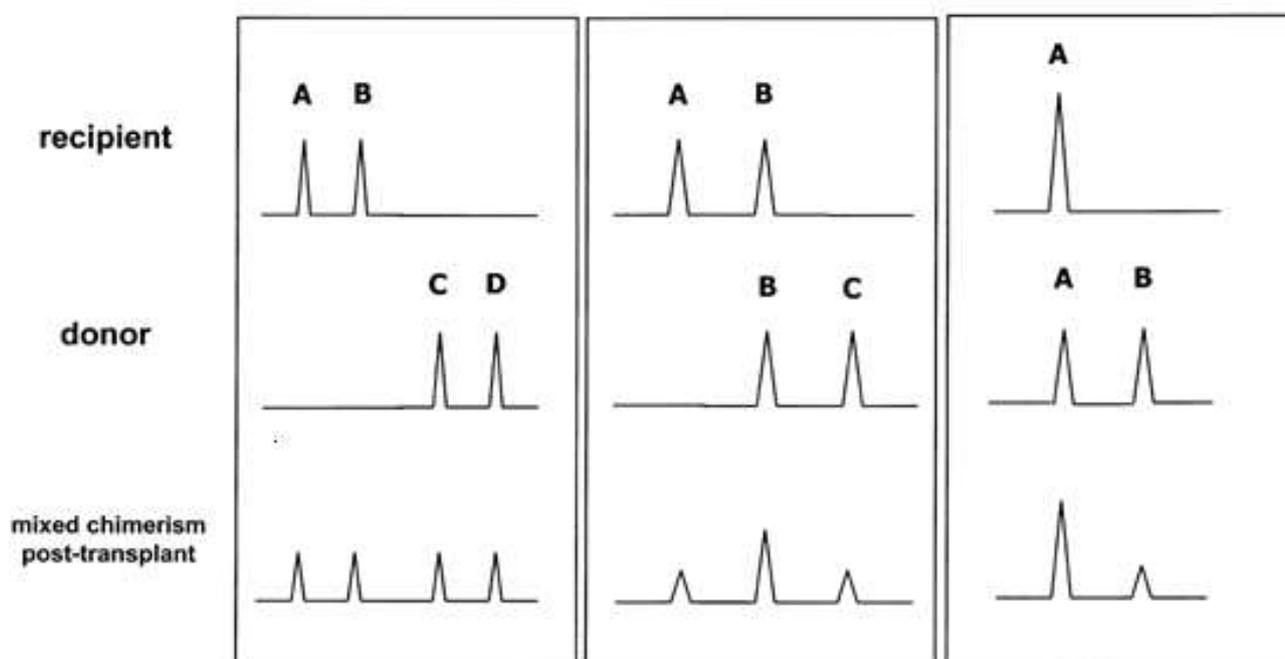


Figura 4. Rappresentazione grafica delle combinazioni alleliche descritte da Thiede et al 1999. A,B: alleli del ricevente; C, D: alleli del donatore. I. Ricevente e donatore sono omo o eterozigoti e non hanno alleli in comune; II. Ricevente e donatore sono eterozigoti ed hanno un allele in comune; III. Ricevente è omozigote ed il donatore è eterozigote ed hanno un allele in comune.

Tipo I

Nei loci di Tipo I il ricevente ed il donatore non hanno alcun allele in comune. L'utilizzo di questo tipo di locus fornisce un risultato più accurato e riproducibile. Quindi quando è possibile, è raccomandabile utilizzare solo i loci pienamente informativi per il calcolo della percentuale di chimerismo.

In questa categoria rientrano varie condizioni che si possono riscontrare:

- se ricevente e donatore sono entrambi eterozigoti (con nessun allele in comune) si può utilizzare la seguente formula:

$$\%D = \frac{D1 + D2}{D1 + D2 + R1 + R2} \times 100$$

- se ricevente e donatore sono entrambi omozigoti (con nessun allele in comune) si può utilizzare la seguente formula:

$$\%D = \frac{D}{D + R} \times 100$$

- se e il ricevente è eterozigote e il donatore è omozigote (con nessun allele in comune):

$$\%D = \frac{D}{D + R1 + R2} \times 100$$

- se il ricevente è omozigote e il donatore è eterozigote (con nessun allele in comune):

$$\%D = \frac{D1 + D2}{D1 + D2 + R} \times 100$$

Tipo II

Nei loci di Tipo II il ricevente ed il donatore hanno un allele in comune che si trova in condizione di eterozigosi sia nel donatore che nel ricevente. Se vi sono a disposizione loci pienamente informativi (di Tipo I) è preferibile non utilizzare i loci di tipo II, in quanto il fenomeno dello sbilanciamento allelico introduce un delta di errore nel calcolo della percentuale di chimerismo.

- Ricevente e donatore sono entrambi eterozigoti (uno degli alleli è in comune). Si esclude dal calcolo l'allele in comune e si può utilizzare la seguente formula:

$$\%D = \frac{D}{D + R} \times 100$$

Tipo III

I loci di Tipo III sono loci non informativi in quanto l'allele condiviso tra donatore e ricevente si trova in condizione di omozigosi in uno di questi:

- il ricevente è omozigote e il donatore è eterozigote (uno degli alleli è in comune);
- il ricevente è eterozigote e il donatore è omozigote (uno degli alleli è in comune).

In questi ultimi due casi non si può fare un calcolo accurato, poiché non è possibile discriminare il contributo dato al picco condiviso dall'allele del donatore e dall'allele del ricevente.

Nonostante ciò, alcuni autori hanno proposto delle formule per riuscire a ricavare in casi estremi la percentuale di donatore. Il dato ottenuto però è da considerarsi estremamente poco attendibile in quanto il calcolo è basato sui dati di tre alleli che co-migrano allo stesso punto, quindi la probabilità di saturazione del picco è molto più alta **(5)**.

Dopo aver ottenuto la percentuale per ciascun locus informativo, si sommano tutti i valori e si fa la media tra questi. Il risultato è la percentuale di cellule del donatore nel campione post-trapianto. Per differenza si ricava la percentuale di cellule del Ricevente.

5.5. Problematiche nell'interpretazione dei dati

• Problemi tecnici

Picchi anomali possono essere determinati dalla chimica dello strumento: *spikes*, *dye blobs* e *noise* possono rendere difficile la differenziazione degli alleli (**Figura 5**).

- ***spikes***: si tratta di picchi stretti e molto alti che si presentano in tutti i colori e nella stessa posizione, la causa della cui formazione sembra essere dovuta a fenomeni di cristallizzazione del polimero o dalla formazione di bolle d'aria nei capillari che causano le cadute di voltaggio. Se il fenomeno persiste anche dopo aver cambiato le soluzioni in uso è consigliabile contattare la ditta fornitrice dello strumento.
- ***dye blobs***: avvengono quando i tempi di decadimento e la qualità di stoccaggio dei kits non sono ottimali, con conseguente distacco della fluorescenza dai primers e formazione di picchi anomali più larghi rispetto al normale.
- ***noise***: rappresentano il rumore di fondo di una corsa, anche se l'altezza degli RFU e l'esperienza dell'operatore saranno in grado di discriminare i picchi veri dagli artefatti. Qualora il rumore di fondo fosse troppo alto, è consigliabile ripetere la corsa elettroforetica, eventualmente cambiando il *buffer* e l'acqua; è consigliabile, inoltre, controllare il numero di corse del capillare e la scadenza del polimero. Si ricorda che se il sequenziatore si trova in un locale a temperatura non controllata, specialmente in estate le temperature troppo elevate possono alterare la qualità del polimero. In questo caso è consigliabile intercambiarlo spesso con una unità mantenuta a + 4 C°.

• Problemi biologici

- ***Stutter***: solitamente più corti di una ripetizione rispetto al picco dell'allele nominale, gli *stutter* (**Figura 5**) si formano come conseguenza dello scivolamento della polimerasi nell'amplificare ripetizioni in tandem durante la reazione di PCR. Questo comporta che per ciascun allele si abbia un *pattern*

con più bande il che rende complicata l'interpretazione dei dati, in modo particolare per campioni di DNA che sono una miscela di due o più individui. La presenza degli *stutter* è peculiare per ogni locus ed aumenta all'aumentare del peso molecolare. Solitamente il valore % dello *stutter* non supera il 10% rispetto all'allele di riferimento, in un range compreso tra 3%- 10%. Si deve prestare particolare attenzione a questo problema soprattutto nei casi di basso valore di chimerismo laddove la % di *stutter* può influire sul il calcolo in modo significativo. Alla luce di quanto suddetto, prestando le dovute attenzioni ai casi suindicati, è consigliabile impostare nel software un valore soglia generico del 10%, al di sotto del quale un picco è considerato automaticamente *stutter* dal software.

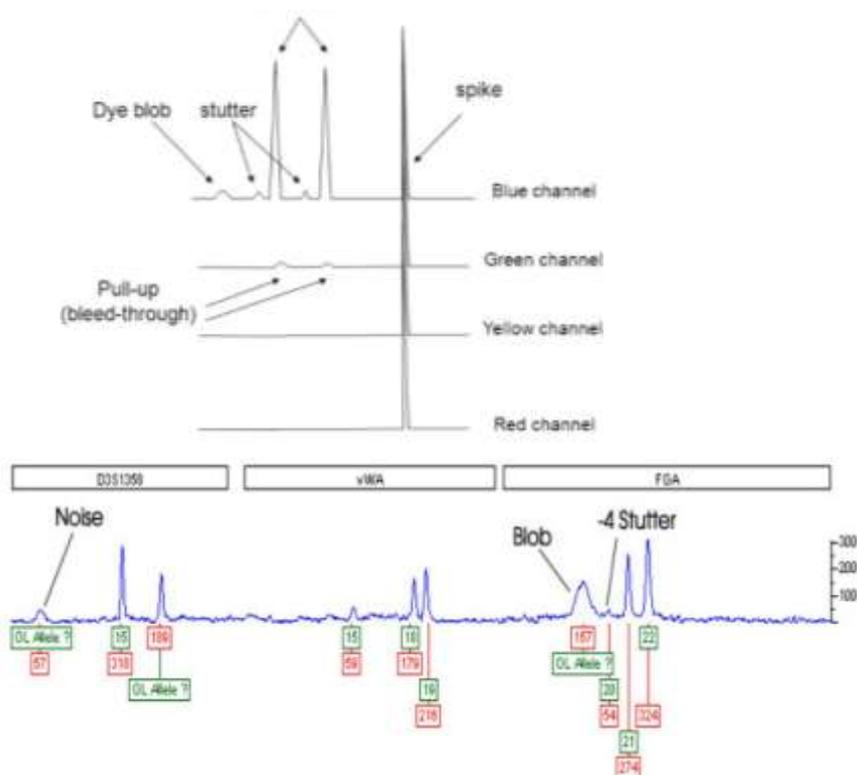


Figura 5. Esempi di picchi anomali.

Suggerimenti:

1) Se tra il donatore e ricevente vi sono tanti loci informativi (superiori a 3), si può, in modo “calcolato” e razionale e solo per alcuni loci, escludere dal calcolo quelli nei quali vi è una sovrapposizione tra stutter ed alleli del ricevente o del donatore.

2) Nel caso in cui vi fossero pochi loci informativi (<3) determinare a quanto ammonta la relativa percentuale dello stutter rispetto all’allele nominale nel campione in esame. Successivamente sottrarre questa quota considerata “RUMORE DI FONDO” all’allele coincidente con lo stutter. Se non si ha un numero sufficiente di marcatori, è consigliabile aumentare il numero degli alleli da studiare o attraverso l’utilizzo di altri Kit con alleli differenti, o di kit con più loci rappresentati.

3) La Valutazione del Coefficiente di variazione (CV) con valori statisticamente accettabili (< 5%), può rappresentare un ulteriore parametro di validazione del test che

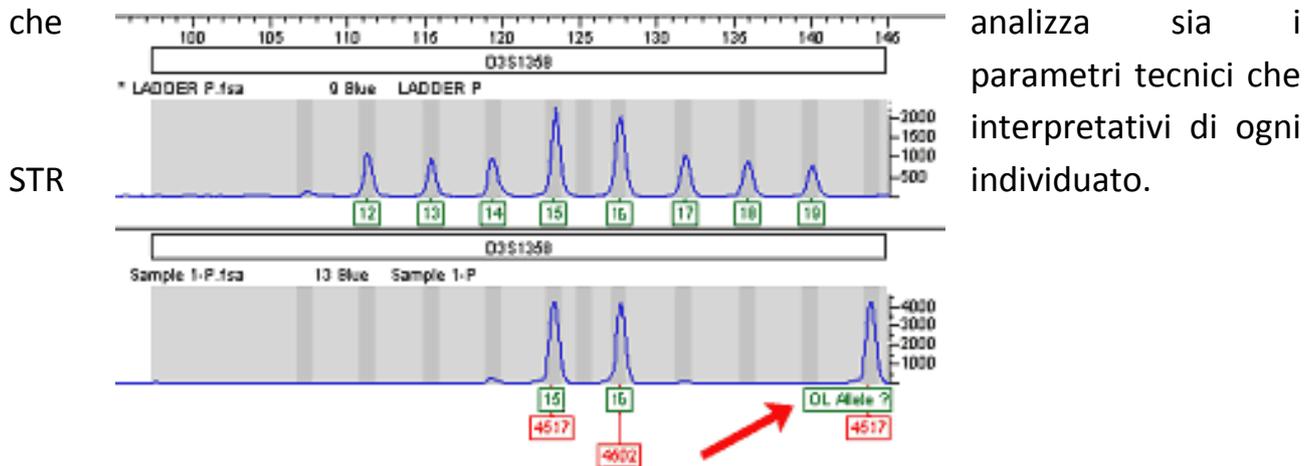


Figura 6. Esempio di *off ladder* (OL).

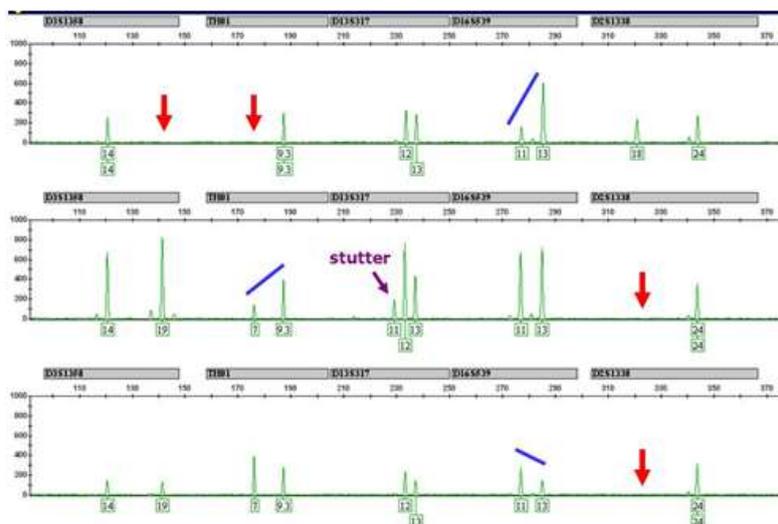
- **Off ladder (OL).** Esistono degli alleli rari che differiscono dalle forme più comuni per una o più coppie di basi a causa di inserzioni, delezioni, etc., Questi alleli vengono definiti *off-ladder* (OL), perché differiscono di più di circa 0,5 bp dal corrispondente allele contenuto nel marcatore (**Figura 6**), su cui non viene effettuata automaticamente l’assegnazione allelica ad opera del

software di genotipizzazione. In presenza di OL, quindi, è opportuno sottoporre l'amplificato ad una nuova elettroforesi capillare e se si dovesse riconfermare un vero allele OL, ovvero un allele mai riportato in letteratura, è bene sequenziare la regione polimorfica per determinarne la struttura precisa.

Low copy number DNA

Durante l'analisi del follow-up post-TMO, potremmo trovarci a lavorare con una quantità di DNA molto scarsa. Sebbene i kit attualmente in commercio richiedono una quantità standard di DNA che varia tra 1-25 ng, qualora ci trovassimo in presenza di Low Copy Number di DNA (< 500 pg), potremmo andare incontro ai seguenti problemi:

- Un **basso valore degli RFU**: occorre pertanto controllare che il valore degli RFU sia sempre > di 500, altrimenti durante la PCR, il rapporto quantitativo tra i diversi contribuenti non viene mantenuto.
- Lo **sbilanciamento allelico**, che avviene quando in un locus in eterozigosi le altezze dei due picchi si presentano tra loro sbilanciate. Questo fenomeno è causato da effetti stocastici durante la reazione di PCR che producono amplificazioni preferenziali di uno dei due alleli (**Figura 7, linea blu**).
- **Drop-out allelico** o **allele nullo** rappresenta una forma estrema dello sbilanciamento allelico; si verifica in condizioni di DNA scarso o degradato, come conseguenza di questo problema, un campione eterozigote per un determinato locus apparirà come omozigote, quindi verrà perso uno dei due alleli (**Figura 7, freccia rossa**).
- **Drop-In allelico**, anche questo fenomeno può essere una conseguenza della scarsità di DNA; possono comparire dei picchi aspecifici derivanti da contaminazioni ambientali che normalmente vengono perse in quanto competono con il DNA stampo; qualora la quantità di DNA stampo fosse particolarmente esigua, la competizione risulterà a favore del DNA aspecifico, dando luogo ad un *drop-in allelico*.



Profilo corretto: 14,19 7,9.3 12,13 11,13 18,24

Figura 7. Esempi di problemi legati alla quantità scarsa del DNA in esame: sbilanciamento allelico (linea blu), *drop-out* allelico (freccia rossa), *stutter* (freccia viola).

- **Eccesso di DNA**

- **Pull-up spikes.** Il fenomeno del *pull-up spikes*, cioè la presenza di picchi aspecifici legati ad una eccessiva quantità di DNA, è dovuto alla mancata separazione da parte del *software* di analisi dei vari fluorocromi, producendo dei picchi di altri colori esattamente della stessa taglia del picco allelico che è andato fuori scala (*off-scale*). Alcuni *software* hanno la possibilità di identificare un picco aspecifico con una linea di colore fucsia, spesso molto alta (**Figura 8**). Se questo impedisse l'analisi del dato, si dovrà ovviamente ripetere la corsa, eventualmente ripetere la PCR con una quantità minore di DNA e se il fenomeno perdura occorrerà tenere in considerazione l'eventualità che lo spettrofotometro non legga correttamente.

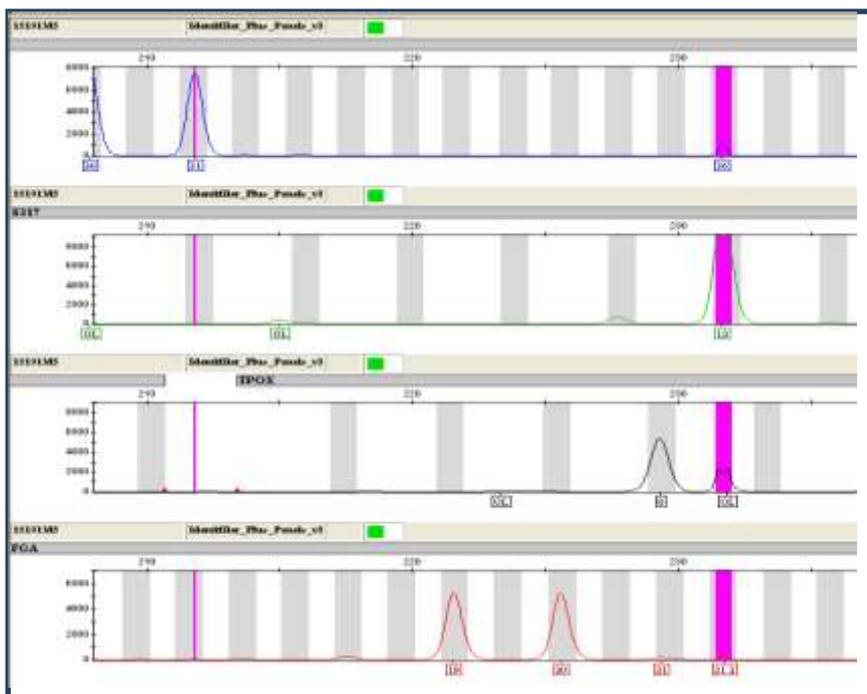


Figura 8. Esempio di *off-scale* (barra fucsia).

- **Adenilazione.** L'adenilazione dell'amplicone o doppio picco si può verificare quando l'enzima Taq-polimerasi non riesce ad aggiungere un'adenosina all'estremità 3' in tutti i prodotti di PCR per eccesso di DNA stampo. L'elettroferogramma presenterà dei picchi spaccati e più larghi che impediranno al *software* di effettuare un'accurata attribuzione allelica (**Figura 9**).

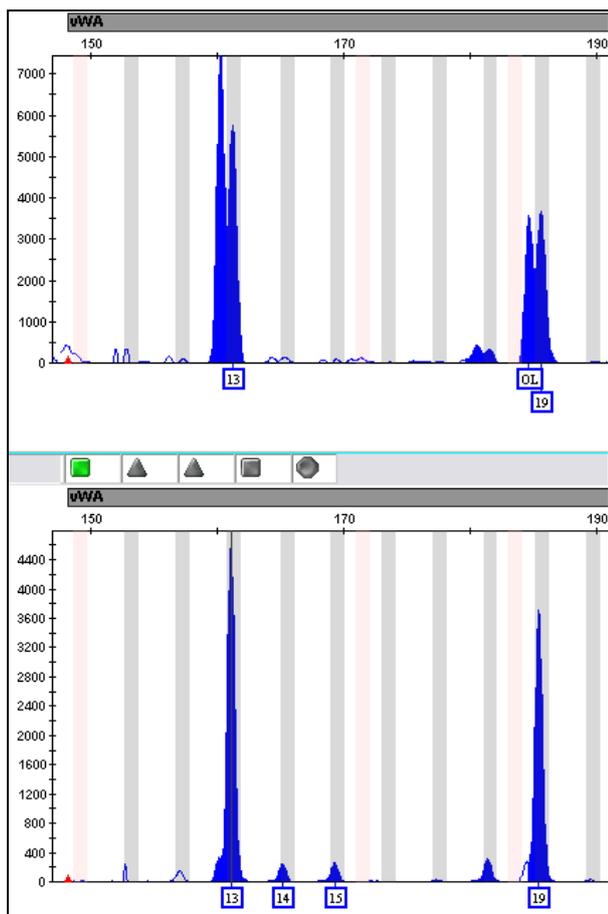
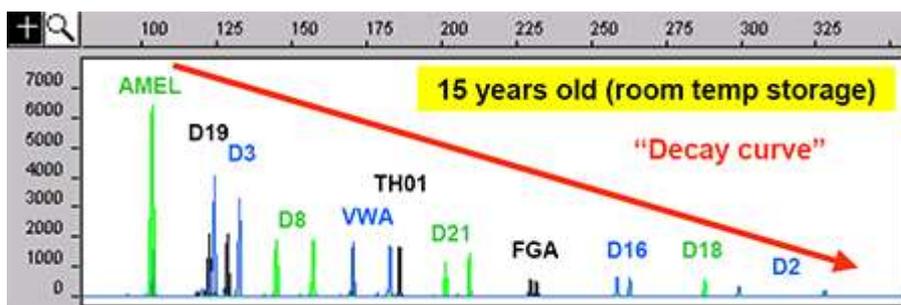


Figura 9. Problema di valutazione dovuto alla presenza di doppi picchi. Nel pannello in basso si possono osservare dei picchi di morfologia normale, ove l’altezza risulta intorno a 4400, mentre nel pannello sovrastante l’altezza è di 7000 RFU.

- **DNA degradato**

- **Drop-out.** Quando il DNA è degradato o viene inibito da alcuni componenti quali la presenza di emoglobina, l’amplificazione dei frammenti risulterà inversamente proporzionale alla dimensione del locus. Alcuni loci con ampliconi più lunghi quali FGA o D18S51 sono i primi a subire il fenomeno del **drop-out** (Figura 10).



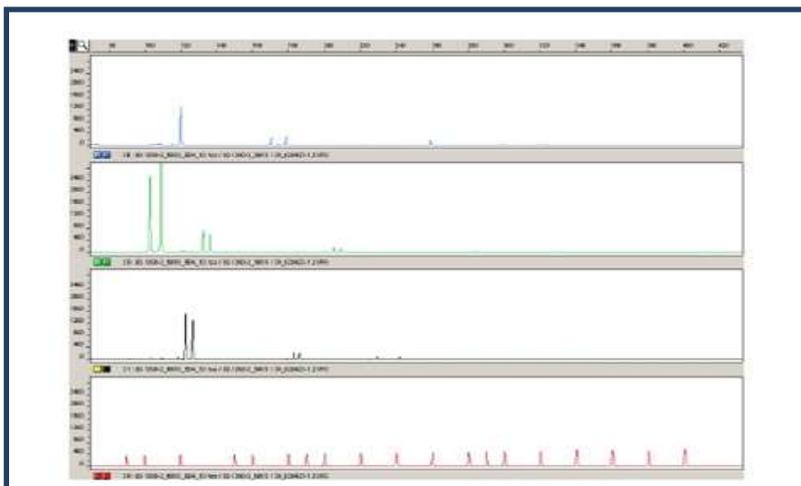


Figura 10: Esempi di elettroferogramma con DNA degradato.

5.6. Campione non valutabile

Il campione è da considerare non valutabile quando:

- non si troveranno loci informativi (di Tipo I e di Tipo II) tra D e R;
- non si ha amplificazione del controllo positivo;
- si ha contaminazione del controllo negativo;
- non si ha amplificazione perché il DNA è troppo concentrato o troppo diluito;
- se l'altezza dei picchi di amplificazione sono < di 500 RFU nonostante le ripetute amplificazioni (almeno 2) del campione.

In ogni caso è sempre consigliabile prima di dare una risposta di **non valutabilità**, utilizzare un kit diverso (se posseduto) per gli *STRs* al fine di ottenere loci informativi, ripetere la corsa elettroforetica oppure ripetere l'amplificazione modulando la concentrazione del DNA dopo una corretta lettura allo spettrofotometro.

6. Allegato n°2

6.1 Studio del chimerismo mediante Q-PCR: principio della metodica

L'amplificazione del DNA per le zone contenenti le Inserzioni/Delezioni viene eseguita mediante un numero di *singleplex PCR* pari al numero di marcatori disponibili per l'analisi, controllo positivo e controllo negativo. Ciascuna reazione contiene una sonda TaqMan rilevabile mediante fluorescenza e ciascuna PCR è stata studiata per avere un'efficienza paragonabile come peraltro è paragonabile la lunghezza dei prodotti di PCR. I risultati si presentano sotto forma di Amplification

Plot in cui sono riportati in ascissa i Cicli e in ordinata il segnale di fluorescenza normalizzato.

6.2 Studio del chimerismo mediante Q-PCR: materiali

L'approccio allo studio del chimerismo mediante Q-PCR richiede:

- kit commerciali, distribuiti anche in Italia, oppure reazioni home made validate in laboratorio
- strumento di Real-Time PCR per eseguire contemporaneamente il programma termico e la rilevazione del segnale di fluorescenza. Alcuni kit commerciali hanno delle preferenze sulla strumentazione da utilizzare in base alla validazione effettuata. In ogni caso lo strumento utilizzato deve seguire un programma di manutenzione periodica come indicato dalla ditta costruttrice e/o dagli utilizzatori. Si consiglia di utilizzare il profilo di amplificazione come indicato dalla relativa metodica.
- software di analisi

6.3 Studio del chimerismo mediante Q-PCR: standardizzazione/validazione intra-laboratorio

Ciascun laboratorio, prima di utilizzare in routine questa metodica, deve standardizzare e validare il sistema prendendo in esame i seguenti parametri per la Real-Time PCR: efficienza, sensibilità, riproducibilità, accuratezza e linearità.

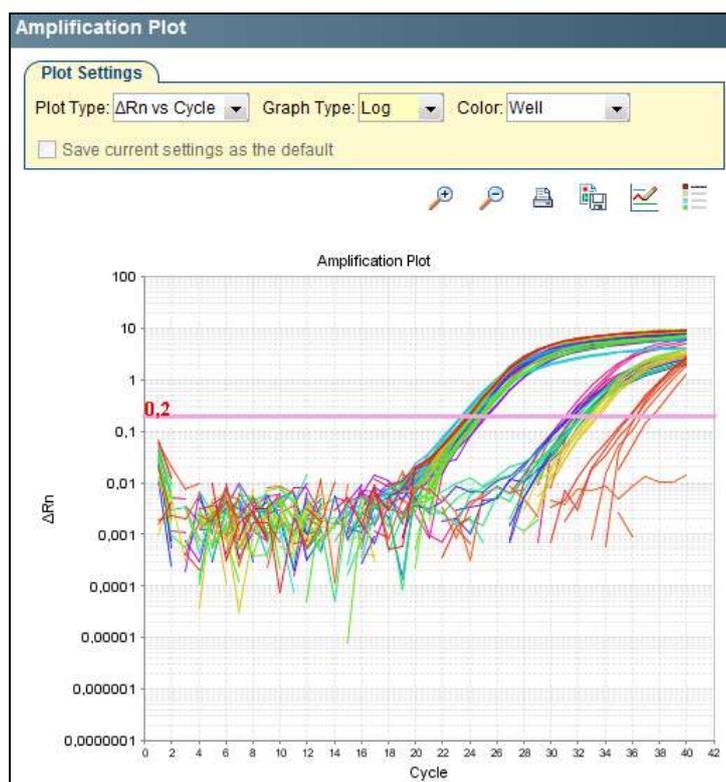
Per la Real Time PCR, oltre alla definizione del programma termico, è necessario definire threshold, base-line, reporter, quencher, passive reference e chimica dei reagenti. In generale per assicurare la riproducibilità del dato in termini di specificità, sensibilità, accuratezza e linearità, occorre stabilire internamente ad ogni laboratorio, il range di qualità del DNA (260/280nm >1,8) e di quantità del DNA (10-250ng) eseguendo una curva standard per valutare, definire e documentare la quantità di DNA più adeguata da utilizzare. Inoltre, per escludere contaminazioni, ad ogni PCR dovrebbe essere eseguito un No Template Control (NTC).

6.4 Studio del chimerismo mediante Q-PCR: analisi ed interpretazione dei dati

Per quanto riguarda la PCR di quantificazione mediante Real Time, trattandosi di una quantificazione relativa (metodo Ct comparativo o metodo $\Delta\Delta Ct$) è necessario utilizzare/definire anche:

- DNA di riferimento: per la quantificazione deve essere usato un DNA contenente il 100% di ricevente (quantificazione per valutare la percentuale di ricevente), o un DNA contenente il 100% di donatore (quantificazione per valutare la percentuale di donatore)
- marcatore di riferimento: per la quantificazione deve essere utilizzato sempre un marcatore di riferimento, sia per il calcolo della percentuale di ricevente che per il calcolo della percentuale di donatore
- marcatore/i informativo/i: per la quantificazione dovrebbero essere utilizzati almeno due marcatori informativi per il ricevente, se disponibili, o un marcatore informativo per ciascun donatore, se disponibile.

Definire inoltre il software di analisi della Real Time PCR; i risultati sono visualizzabili sotto forma di Amplification Plot: in ascissa i Cicli, in ordinata il segnale di fluorescenza normalizzato con indicata la threshold (es. 0,2).



Per l'analisi pre-trapianto mediante Real Time-PCR, l'informatività di un marcatore è data dalla presenza e relativa assenza di amplificazione nella controparte. Il ciclo soglia, Ct, di ciascun marcatore informativo, da una indicazione sulla sensibilità di quel marcatore per quel soggetto.

Per l'analisi post-trapianto, trattandosi di una quantificazione relativa, il metodo di calcolo è quello del Ct comparativo o metodo $\Delta\Delta Ct$; definire il metodo di normalizzazione mediante un algoritmo validato ricordando che ci sono marcatori più sensibili o più accurati e ricordando anche che i marcatori possono essere soggetti a riarrangiamenti/mutazioni cromosomiche, costituzionali e/o acquisite.

7. Bibliografia

- 1) **Nollet F**, Billiet J, Selleslag D, Criel A. Standardisation of multiplex fluorescent short tandem repeat analysis for chimerism testing. *Bone Marrow Transplant.* **2001** Sep;28(5):511-8
- 2) **Thiede C**. Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. *Am J Pharmacogenomics.* **2004**;4(3):177-87. Review
- 3) **Odriozola A**, Riancho JA, Colorado M, Zarrabeitia MT. Evaluation of the sensitivity of two recently developed STR multiplexes for the analysis of chimerism after haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet.* **2013** Apr;40(2):88-92.
- 4) **Thiede C**, Florek M, Bornhäuser M, Ritter M, Mohr B, Brendel C, Ehninger G, Neubauer A. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant.* **1999** May;23(10):1055-60
- 5) **Kristt D**, Gesundheit B, Stein J, Shapira MY, Or R, Amar A, Yaniv I, Garty B, Itah R, Israeli M, Klein T. Quantitative monitoring of multi-donor chimerism: a systematic, validated framework for routine analysis. *Bone Marrow Transplant.* **2010** Jan;45(1):137-47
- 6) **Clark JR**, Scott SD, Jack AL, Lee H, Mason J, Carter GI, Pearce L, Jackson T, Clouston H, Sproul A, Keen L, Molloy K, Folarin N, Whitby L, Snowden JA, Reilly JT, Barnett D. Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): technical recommendations for the use of short tandem repeat (STR) based techniques. *Br J Haematol.* 2015 Jan;168(1):26-37.
- 7) **Lion T**, Watzinger F, Preuner S, Kreyenberg H, Tilanus M, de Weger R, van Loon J, de Vries L, Cavé H, Acquaviva C, Lawler M, Crampe M, Serra A, Saglio B, Colnaghi F, Biondi A, van Dongen JJ, van der Burg M, Gonzalez M, Alcoceba M, Barbany G, Hermanson M, Roosnek E, Steward C, Harvey J, Frommlet F, Bader P.
The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* **2012** Aug;26(8):1821-8 .

