

Mentype[®] AMLplex^{QS}

PCR Amplification Kit

Gebrauchsanweisung (IFU)



0483

In-vitro Diagnostikum

AMLIFU02v2de

23.07.2025



45-12100-0025

45-12100-0100

45-12100-0400



Charge



BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Website:

E-Mail: support@biotype.de

Bestellung: sales@biotype.de



Änderungshinweis

Bitte beachten Sie die folgenden Anpassungen gegenüber der vorherigen IFU-Version:

Dokumentennummer	Änderungen	Datum
AMLIFU02v1de	Initiale Version	28.05.2025
AMLIFU02v2de	Aktualisierung Tabelle 8	23.07.2025

Eine gedruckte Version dieser IFU kann innerhalb von 7 Tagen kostenlos zur Verfügung gestellt werden.

Für diese oder andere Anfragen, kontaktieren Sie uns bitte unter:
+49 351 8838 400 oder support@biotype.de

Inhalt

Zweckbestimmung	4
Wissenschaftlicher Hintergrund	4
Beschreibung des Produkts	5
Mitgelieferte Materialien	7
Beschreibung der Komponenten	8
Reagenzienlagerung und -handhabung	9
Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien	9
Allgemeine Laborausstattung.....	9
Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterial.....	10
Geräte und Software	11
Probenmaterial	13
Warnungen und Sicherheitsmaßnahmen.....	13
Hinweis für den Nutzer	14
Verfahren	15
Überblick über den experimentellen Arbeitsablauf	15
Probenvorbereitung.....	15
Vorbereitung der Kontrollproben	19
Mastermix Ansatz.....	19
PCR-Amplifikation	21
Kapillargelelektrophorese.....	23
Vorbereitung der PCR-Produkte	23
Fragmentlängenanalyse.....	24
Datenanalyse	26
Allgemeines Verfahren für die Datenanalyse.....	26
Probenanalyse	30
Datenanalyse mit GeneMapper™ ID-X.....	32

Troubleshooting.....	36
Leistungsbewertung.....	39
Qualitätskontrolle	50
Technische Unterstützung.....	50
Referenzen.....	51
Nutzungsbeschränkungen.....	52
Informationen zur Bestellung	53
Markenzeichen und Haftungsausschlüsse	53
Erläuterung von Symbolen	55
Anhang.....	57

Zweckbestimmung

Das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit ist ein manueller Assay für den qualitativen Nachweis von 11 Genfusionen mit insgesamt 34 Transkriptvarianten. Die Identifizierung dieser Chromosomenaberrationen haben eine diagnostische, prognostische und therapeutische Relevanz für erwachsene Patienten, die an Akuter Myeloischer Leukämie (AML) erkrankt sind oder bei denen ein entsprechender Verdacht besteht.

Der Assay verwendet komplementäre DNA (cDNA), die durch reverse Transkription von RNA aus Vollblut- oder Knochenmarksproben extrahiert wird.

Das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit dient dem Nachweis von Chromosomenaberrationen, die für klinische Entscheidungen bei akuter myeloischer Leukämie relevant sind. Die Identifizierung dieser spezifischen genetischen Translokationen ermöglicht die Klassifizierung von Leukämieerkrankungen und liefert wesentliche Informationen für eine risikoorientierte Therapieentscheidung für Patienten.

Das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit ist für professionelle Laboranwender bestimmt, die in molekulargenetischen Techniken, Multiplex-PCR und in der Handhabung mit Genetic Analyzers von Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems™) geschult sind.

Wissenschaftlicher Hintergrund

Der Nachweis spezifischer Chromosomenaberrationen hat bei fast allen Arten akuter Leukämien einen hohen prognostischen Wert. Der molekularbiologische Nachweis von Chromosomenaberrationen (Translokationen) stellt eine wichtige diagnostische Ergänzung dar. Der Nachweis spezifischer Translokationen ermöglicht die Subtypeneinteilung von Leukämieerkrankungen und liefert wesentliche Informationen für die risikoorientierte Therapie von Patienten.

Das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit ermöglicht den Nachweis der häufigsten Chromosomenaberrationen, die bisher bei AML beobachtet wurden, und stellt ein einfach anzuwendendes, routinetaugliches und zuverlässiges Screening-Tool dar.

Beschreibung des Produkts

Das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit enthält optimierte Reagenzien für den hochauflösenden Nachweis von 11 Fusionsgenen mit insgesamt 34 Transkriptvarianten (siehe [Tabelle 1](#)). Die Benennung der Varianten folgt historisch etablierten Nomenklaturen, insbesondere für KMT2A (Schnittger et al., 2000). Eine vollständige Liste der Gene, ihrer alternativen Namen und der Transkript-IDs, die für systematische Variantenbeschreibungen verwendet wurden, findet sich im Anhang (siehe [Liste der Zielgene](#)).

Der Assay enthält eine interne PCR-Kontrolle (Quality Sensor "QS-Control"), die templateunabhängig ist, und eine templateabhängige cDNA-Kontrolle (ABL-Control), die hilfreiche Informationen über die PCR-Effizienz, die Qualität der verwendeten cDNA-Templates und das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren liefern.

Der Test wird durch Fragmentanalyse mittels Kapillargel-Elektrophorese durchgeführt. Ein Primer für jedes Transkript ist mit 6-FAM, BTG oder BTY fluoreszenzmarkiert, die Farbspektren des Zubehörs Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE, GmbH).

Tabelle 1 Genfusionen und Transkriptvarianten, die mit dem Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit nachgewiesen werden können

Genfusion	Chromosomale Abberation	Variante	Systematische Variantenbeschreibung
RUNX1::RUNX1T1	t(8;21) (q22;q22.1)	-	RUNX1:e6::RUNX1T1:e3
BCR::ABL	t(9;22) (q34.1;q11.2)	e1a3	BCR:e1::ABL1:e3
		e1a2	BCR:e1::ABL1:e2
		b3a2	BCR:e14::ABL1:e2
		b3a3	BCR:e14::ABL1:e3
		b2a2	BCR:e13::ABL1:e2
		b2a3	BCR:e13::ABL1:e3
PICALM::MLLT10	t(10;11) (p12.3;q14.2)	MLLT10_240- PICALM_1987	MLLT10:e3::PICALM:e19
		MLLT10_240- PICALM_2092	MLLT10:e3::PICALM:e20
CBFB::MYH11	inv(16) (p13.1;q22)	Typ A	CBFB:e5::MYH11:e33
		Typ B	CBFB:e5::MYH11:e32
		Typ C	CBFB:e5::MYH11:e31
		Typ D	CBFB:e5::MYH11:e29

Genfusion	Chromosomale Abberation	Variante	Systematische Variantenbeschreibung
		Typ E	CBFB:e5::MYH11:e28
		Typ F	CBFB:e4::MYH11:e33
		Typ G	CBFB:e4::MYH11:e29
		Typ H	CBFB:e4::MYH11:e28
		Typ I	CBFB:e4::MYH11:e34
		Typ J	CBFB:e5::MYH11:e30
DEK::NUP214	t(6;9) (p23.3;q34.1)	-	DEK:e9::NUP214:e18
KMT2A::MLLT4	t(6;11) (q27;q23.3)	-	KMT2A:e8::AFDN:e3
KMT2A::MLLT3	t(9;11) (p21.3;q23.3)	6A (6A_S;	KMT2A:e8::MLLT3:e6
		6A_L	
		7A	KMT2A:e8::MLLT3:e7
		8A	KMT2A:e8::MLLT3:e8
KMT2A::ELL	t(11;19) (q23.3;p13.1)	6B	KMT2A:e8::MLLT3:e6
		e10e2	KMT2A:e8::ELL:e2
KMT2A-PTD	Partial Tandem Duplication	e10e3	KMT2A:e8::ELL:e3
		e9e3	KMT2A:e8::KMT2A:e2
		e10e3	KMT2A:e9::KMT2A:e2
		e11e3	KMT2A:e10::KMT2A:e2
NPM1::MLF1	t(3;5) (q25.3;q35.1)	-	NPM1:e6::MLF1:e2
PML::RARA	t(15;17) (q24.1 q21.2)	bcr1	PML:e6::RARA:e3
		bcr2	PML:e5::RARA:e3
		bcr3	PML:e3::RARA:e3

Der Assay wurde durch ein Genfusionscreening von ca. 300 AML-Patienten validiert und seine Eignung in einer vergleichenden klinischen Studie bestätigt.

Die Nachweisgrenze für die qualitative Bewertung liegt bei 400 RFU. Im Durchschnitt können für jede Genfusion mindestens 1000 Kopien nachgewiesen werden.

Der allgemeine Input-Bereich für die reverse Transkriptionsreaktion unter Standardbedingungen ist definiert als 100 ng bis 1 µg Gesamt-RNA, die aus Vollblut oder Knochenmark isoliert wurde.

Der optimale Input für die reverse Transkription beträgt bei Knochenmark 500 ng RNA und bei peripherem Blut 1 µg RNA. 1 µL cDNA wird anschließend für die PCR verwendet.

Mitgelieferte Materialien

Tabelle 2 Inhalt des Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit

Reagenz	Deckelfarbe		Volumen pro Packungsgröße		
			25 Rkt.	100 Rkt.	400 Rkt.
Nuclease-Free Water	Hellblau		1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Lila		125 µL	500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® AMLplex ^{QS} Primer Mix	Rot		63 µL	250 µL	4 x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Weiß		10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Positive Control	Weiß		25 µL	25 µL	25 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Orange		13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Allelic Ladder	Grün		25 µL	25 µL	4 x 25 µL

Eine Übersicht über die Chargennummern der Komponenten finden Sie auf dem Kitinhaltsetikett, das sich auf der Innenseite der Kitbox befindet.

HINWEIS

i

Bitte beachten Sie, dass die Verpackungsgröße die Anzahl der Testungen beschreibt, **ohne** die Anzahl der erforderlichen Kontrollen oder den erforderlichen Überschuss zum Pipettieren zu berücksichtigen. Wir empfehlen die folgende Größe für den entsprechenden Durchsatz zu verwenden:

- < 8 Proben pro PCR: 25 Reaktionen Packungsgröße
- 8 - 45 Proben pro PCR-Lauf: Verpackungsgröße für 100 Reaktionen
- > 45 Proben pro PCR-Lauf: 400 Reaktionen Verpackungsgröße

Beschreibung der Komponenten

Nuclease-Free Water (nuklease-freies Wasser): Wasser in PCR-Qualität, das im PCR-Setup und als No-Template Kontrolle (NTC) verwendet wird.

Reaction Mix A (Reaktionsgemisch A): PCR-Puffer mit dNTPs und MgCl₂. Der PCR-Puffer ist optimiert, um die Enzymaktivität für die PCR zu fördern.

Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix (Primergemisch): Multiplex-Oligonukleotid-Primer-Mix mit markierten Primern (Markierung: 6-FAM™, BTG, BTY) und nicht markierten Primern.

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

Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control (Positivkontrolle): doppelsträngige künstliche Mischung aus fünf DNA-Fragmenten. Sie wird als qualitative, externe PCR-Kontrolle verwendet, die für die folgenden Targets auf allen 3 Panels positiv ist: BCR::ABL_b2a3, RUNX1::RUNX1T1, ABL-control, KMT2A-PTD_e11e3 und PML::RARA_bcr3, zusätzlich wird QS als Qualitätsmarker für die Probenvalidität amplifiziert.

HINWEIS



Die Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control ist für den Labormitarbeiter unbedenklich, da sie aus einzelnen gereinigten DNA-Molekülen besteht, die ungefährlich sind und keine aktiven biologischen Funktionen haben. Sie enthält keine lebenden Zellen oder pathogenen Organismen, die eine direkte Bedrohung darstellen könnten.

DNA Size Standard 550 (BTO) (DNA-Längenstandard): Mischung aus fluoreszenzmarkierten PCR-Fragmenten mit definierten Fragmentlängen zwischen 60 - 550 bp. Die Komponente wird jedem PCR-Produkt vor der Fragmentlängenanalyse zugesetzt, sie wird für eine Größenregression zur genauen Bestimmung der Fragmentlänge der PCR-Produkte verwendet.

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder (Allelleiter): eine Mischung aus fluoreszenzmarkierten PCR-Fragmenten, die alle nachweisbaren Allele des Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kits repräsentieren. Es enthält 22 Fragmente, die mit 6-FAM™ markiert sind, 12 Fragmente, die mit BTG

markiert sind, und 2 Fragmente, die mit BTY markiert sind und als Genotypisierungsreferenz der genauen Allelidentifizierung dienen.

Reagenzienlagerung und -handhabung

Das Kit wird auf Trockeneis versandt. Die Komponenten des Kits sollten im gefrorenen Zustand ankommen, mit Ausnahme der Multi Taq 2 DNA Polymerase. Diese ist in einem Puffer gelagert, der das Einfrieren des Reagenz verhindert.

Bitte überprüfen Sie die Vollständigkeit des Kits bei Erhalt. Verwenden Sie keine Kits, die bei der Ankunft aufgetaut sind. Wenn eine oder mehrere Komponenten nicht gefroren sind oder wenn die Röhrchen oder die Verpackung während des Transports beschädigt wurden, kann die Leistung nicht garantiert werden.

Lagern Sie alle Komponenten lichtgeschützt zwischen -25 °C und -15 °C. Insbesondere der Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix, der DNA Size Standard 550 (BTO) und die Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder müssen lichtgeschützt gelagert werden.

Um Kontaminationen zu vermeiden, empfehlen wir, die Prä-PCR Templates (RNA- und cDNA-Proben, die Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control) und die Post-PCR Komponenten (DNA Size Standard 550 (BTO) und Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder) getrennt von den PCR-Reagenzien (Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A und Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix) zu lagern und zu verwenden.

Die Haltbarkeit des Kits ist auf dem Etikett der Kitbox angegeben oder beträgt 24 Monate nach Öffnung (je nachdem, welcher Zeitpunkt zuerst eintritt). Überschreiten Sie nicht die Höchstzahl von 20 Frieren-Tauen-Zyklen.

Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien

Allgemeine Laborausstattung

- Tischzentrifuge mit einem Rotor für 2 mL und 200 µL Reaktionsgefäße
- Zentrifuge mit einem Rotor für Mikrotiterplatten und 96-Well-Reaktionsplatten

- Vortex-Mischer
- Kalibrierte, einstellbare Pipetten mit aerosoldichten Einweg-Filterspitzen
- Geeignete 200 µL 96-Well-Reaktionsplatten oder 200 µL-Reaktionsgefäße mit entsprechendem Verschlussmaterial, PCR-Qualität
- Geeignete Racks für 2 mL und 200 µL Reaktionsgefäße
- Kühlrack geeignet für 2 mL Röhrchen
- Puderfreie Einweghandschuhe
- NanoDrop™ One Spektrophotometer oder Qubit™ Fluorometer

HINWEIS



Das gesamte für die PCR verwendete Material muss von angemessener Qualität sein (DNA-frei und für die Molekularbiologie geeignet). Bitte stellen Sie sicher, dass alle verwendeten Geräte gemäß den Anweisungen und Empfehlungen des Herstellers installiert, kalibriert, überprüft und gewartet wurden.

Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterial

Bitte beachten Sie, dass einige Reagenzien und Verbrauchsmaterialien in bestimmten Kombinationen verwendet werden und nicht alle für jeden Lauf erforderlich sind.

Tabelle 3 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Reagenzien

Reagenz	Anbieter	Bestellnummer
Matrix Standard BT5 multi (25 µL)	BIOTYPE GmbH	45-15100-0025
Matrix Standard BT5 multi (2 x 25 µL)	BIOTYPE GmbH	45-15100-0050
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH	74104
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen GmbH	74134
RNeasy Midi Kit	Qiagen GmbH	75144
NucleoSpin Dx RNA Blood (50 Präparationen)	Macherey-Nagel	740201.50
Maxwell® CSC RNA Blood Kit (48 Präparationen)	Promega	AS1410

Reagenz	Anbieter	Bestellnummer
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific	4374966 4374967
SuperScript™ IV First Strand cDNA Synthesis System	Thermo Fisher Scientific	18091050, 18091200
Hi-Di™ Formamide, 25 mL	Thermo Fisher Scientific	4311320
POP-4™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 Proben)	Thermo Fisher Scientific	4393715
POP-7™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 Proben)	Thermo Fisher Scientific	4393708
Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series	Thermo Fisher Scientific	4393927
Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series	Thermo Fisher Scientific	4408256
3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 36 cm	Thermo Fisher Scientific	4404683
3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 50 cm	Thermo Fisher Scientific	4404685
SeqStudio™ Cartridge	Thermo Fisher Scientific	A33671 A41331
SeqStudio™ Cathode Buffer	Thermo Fisher Scientific	A33401

Geräte und Software

Neben den manuellen säulenbasierten Extraktionsmethoden, wie sie im Kapitel Probenvorbereitung beschrieben sind, kann die RNA-Extraktion wie folgt automatisiert werden:

- Maxwell® CSC-Gerät (Kat. Nr.: AS6000, Promega)

Das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit wurde für die Verwendung mit den folgenden PCR-Cyclern validiert:

- ProFlex PCR System (Kat. Nr.: 4484073 (3 x 32 Well Probenblock), 4484075 (96-Well Probenblock); Thermo Fisher Scientific)
- GeneAmp® PCR System 9700 Silver (Auslaufmodell, Thermo Fisher Scientific)
- Mastercycler nexus gradient (Kat.-Nr.: 6331000017, Eppendorf AG)
- Mastercycler ep-S (Auslaufmodell, Eppendorf AG)
- Biometra Tadvanced (Kat.-Nr.: 846-2-070-211; Analytik Jena)

Die Verwendung von anderen als den oben genannten Geräten muss vom Benutzer validiert werden. Die folgenden Spezifikationen müssen erfüllt sein:

- Beheizter Deckel
- Block geeignet für 200 µL Reaktionsplatten/Röhrchen
- Heiz- und Kühlrate einstellbar auf 4 °C/s

Das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit wurde für die Verwendung mit den folgenden Geräten und Einstellungen validiert:

- Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), Software-Version 4.0.1
 - POP-4™ Polymer für den 3500/3500xL Genetic Analyzer
 - POP-7™ Polymer für 3500/3500xL Genetic Analyzer
 - 3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 36 cm
 - 3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 50 cm
- SeqStudio™ Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), Software-Version 1.2.4

Die Datenanalyse wurde mit der Software durchgeführt:

- GeneMapper™ ID-X Software, Version 1.6 (Thermo Fisher Scientific), unter Verwendung produktspezifischer Templates (siehe Tabelle 11):
 - Analysis Method: AMLplexIVD_Analysis1_v1x oder AMLplexIVD_Analysis4_v1x oder AMLplexIVD_Analysis7_v1x
 - Bins: AMLplexIVD_Bins1_v1x oder AMLplexIVD_Bins4_v1x oder AMLplexIVD_Bins7_v1x
 - Panel: AMLplexIVD_Panel1_v1x oder AMLplexIVD_Panel4_v1x oder AMLplexIVD_Panel7_v1x
 - Size Standard: BTO_60-550_v1x

Eine manuelle Auswertung der fsa-Dateien oder Ergebnisse, die mit der Data Collection Software des Gerätes generiert wurden, ohne die beschriebene Softwareoption zu nutzen, ist nicht validiert.

HINWEIS



Vergewissern Sie sich, dass alle verwendeten Instrumente gemäß den Anweisungen und Empfehlungen des Herstellers installiert, kalibriert, überprüft und gewartet wurden.

Probenmaterial

Die folgenden humanen Proben wurden mit dem Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit validiert:

- Periphere venöse Vollblutproben (EDTA, Citrat, Heparin und Stabilisator RNA Exact), die bei 4 °C gelagert und innerhalb von 24 h zur RNA-Aufreinigung verarbeitet wurden.
- Knochenmarksproben (EDTA, Heparin), die bei 4 °C gelagert und innerhalb von 24 h für die RNA-Aufreinigung aufbereitet wurden.

Die gewonnene RNA ist unverdünnt bei -85 °C bis -70 °C zu lagern.

HINWEIS



Vergewissern Sie sich, dass das für die Blutentnahme verwendete Antikoagulans mit den Anweisungen des Herstellers des RNA-Isolierungskits kompatibel ist.

Warnungen und Sicherheitsmaßnahmen

- Lesen Sie die Gebrauchsanweisung sorgfältig durch, bevor Sie das Produkt verwenden.
- Lesen Sie die Sicherheitsdatenblätter (SDS) und Non-Hazardous Statements (NHS) für alle BIOTYPE-Produkte. Diese senden wir Ihnen auf Anfrage zu oder stehen über die Homepage zum Download bereit (www.biotype.de/sicherheitsdatenblatter). Für Produkte, die keinen besonders besorgniserregenden Stoff enthalten oder anderen Beschränkungen der Verordnung 1272/2008 (CLP) unterliegen und entsprechend kein SDS benötigen, stellt BIOTYPE das SDS auf Anfrage zur Verfügung.
- Bitte wenden Sie sich an die jeweiligen Hersteller, um Kopien der Sicherheitsdatenblätter für zusätzlich benötigte Reagenzien zu erhalten.
- Kitkomponenten verschiedener Kitchargen dürfen nicht gemischt werden.
- Die Aliquotierung der Kitkomponenten in andere Reaktionsgefäße ist nicht zulässig.
- Die Verwendung dieses Produkts ist auf professionelle Laboranwender beschränkt, die in molekulargenetischen Techniken, Multiplex-PCR und

in der Handhabung von Genanalysatoren von Thermo Fisher Scientific geschult sind.

- Überprüfen Sie das Produkt und seine Bestandteile vor dem ersten Gebrauch auf:
 - Unversehrtheit
 - Vollständigkeit in Bezug auf Anzahl, Art und Füllung (siehe Kapitel Mitgelieferte Materialien)
 - Korrekte Beschriftung
 - Zustand bei Ankunft (alle Komponenten gefroren, außer Multi Taq 2 DNA Polymerase)
- Proben sollten immer als infektiös und/oder biologisch gefährlich, sowie in Übereinstimmung mit guter Laborpraxis behandelt werden.
- Verwenden Sie kein Kit, dessen Ablaufdatum überschritten ist.
- Entsorgen Sie die Proben und den Kitabfall gemäß den örtlichen Sicherheitsvorschriften.
- Alle verwendeten Instrumente müssen gemäß den Anweisungen und Empfehlungen des Herstellers installiert, kalibriert, überprüft und gewartet worden sein.

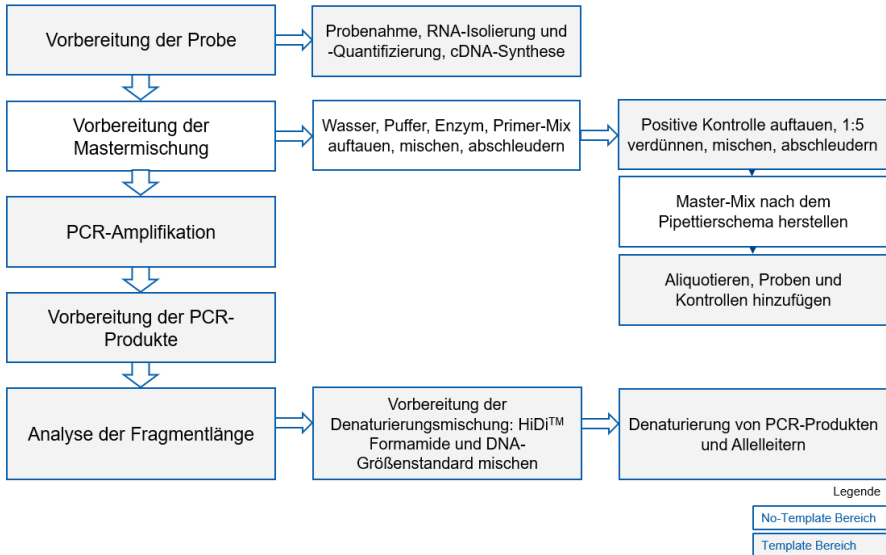
Hinweis für den Nutzer

Jedes Problem, das im Zusammenhang mit dem Produkt auftritt, ist dem Hersteller zu melden. Alle schwerwiegenden Zwischenfälle im Zusammenhang mit diesem Kit müssen dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates, in dem der Anwender und/oder der Patient ansässig ist, gemeldet werden.

Eine Zusammenfassung der Sicherheit und Leistung (Summary of Safety and Performance, SSP) wird gemäß Artikel 29 der Verordnung (EU) 2017/746 erstellt und soll den vorgesehenen Anwendern, im Falle dieses Produkts ausschließlich Laborspezialisten, den öffentlichen Zugang zu einer aktualisierten Zusammenfassung der Daten über die Sicherheit und Leistung des Produkts über die EUDAMED-Datenbank verschaffen.

Verfahren

Überblick über den experimentellen Arbeitsablauf



Probenvorbereitung

Anforderungen an das Ausgangsmaterial

Für das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit wird cDNA als Probenmaterial verwendet. Diese cDNA wird durch die Transkription von RNA gewonnen, welche aus humanem peripheren venösen Vollblut oder Knochenmark isoliert wurde.

Wir empfehlen die Verwendung von Reagenzien zur RNA-Stabilisierung während der Probenentnahme. RNA-Stabilisatoren tragen zur Erhaltung der RNA-Integrität bei (z. B. S-Monovette RNA Exact). Die RNA-Isolierung sollte zeitnah nach der Probenentnahme erfolgen.

HINWEIS



Eine lange Lagerung des Ausgangsmaterials kann zu einer Fragmentierung des genetischen Materials und damit zu einer unzureichenden Qualität führen. Dies kann das Analyseergebnis verschlechtern, z. B. durch verminderte Signale oder invalide interne Kontrollen.

Blut

Entnehmen Sie mindestens 200 µL peripheres venöses Vollblut für das folgende Verfahren.

Die Handhabung des Ausgangsmaterials (peripheres venöses Vollblut) sollte den Empfehlungen der Richtlinie MM05-A2 (2. Auflage) des *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) entsprechen: Vollblut kann bei Raumtemperatur (22 °C bis 25 °C) bis zu 24 Stunden oder bei 2 °C bis 6 °C für 72 Stunden oder länger gelagert werden. Außerdem wird empfohlen, für die Vollblutentnahme EDTA, Citrat oder Heparin als Antikoagulans zu verwenden.

Knochenmark

Entnehmen Sie mindestens 200 µL Knochenmark für das folgende Verfahren.

Die Handhabung des Ausgangsmaterials (Knochenmarkaspirat) sollte den Empfehlungen der CLSI-Richtlinie MM05-A2 (2. Auflage) entsprechen: Antikoagulierte (EDTA oder Citrat) Knochenmarkaspirate sollten bei 4 °C gelagert und transportiert werden. Außerdem wird empfohlen, für die RNA-Extraktion aus Knochenmarkaspiraten diese innerhalb von 1 bis 4 Stunden nach der Entnahme durchzuführen.

RNA-Extraktion

Führen Sie die RNA-Extraktion und -Aufreinigung aus peripherem venösem Vollblut (PB) oder Knochenmarksaspiraten (BM) mit einem der folgenden Kits durch:

- RNeasy® Midi/ Mini/ Plus Mini Kit (Qiagen GmbH) für die Antikoagulanzen EDTA, Citrat und Heparin auf BM und PB

- NucleoSpin® Dx RNA Blood (Macherey-Nagel) für stabilisierte RNA Exact auf PB
- Maxwell® CSC RNA Blood Kit (Promega) für die Antikoagulanzen EDTA und Heparin auf BM

Bitte beachten Sie die Anleitungen und Empfehlungen des Herstellers zur RNA-Extraktion. Es wird empfohlen, während der Isolierung einen **DNase-Verdau** gemäß den Anweisungen des Herstellers durchzuführen.

HINWEIS



Eine Blutkontamination kann in der PCR-Reaktion oder in der isolierten RNA durch eine orangene Färbung erkannt werden. Wenn eine Farbveränderung beobachtet wird, empfehlen wir die RNA-Extraktion zu wiederholen, um eine mögliche Interferenz zu vermeiden.

HINWEIS



Achten Sie darauf, dass alle Spuren von Ethanol vor der Elution der Nukleinsäure entfernt werden. Ethanol ist ein starker Inhibitor der PCR.

RNA-Quantifizierung und Verdünnung

Bestimmen Sie die RNA-Konzentration durch UV/VIS-Spektroskopie bei 260 nm mit dem NanoDrop™ One Spectrophotometer oder durch Fluoreszenzspektroskopie mit dem Qubit™ Fluorometer.

Bei Verwendung der Spektralphotometrie wird der Elutionspuffer aus dem RNA-Extraktionskit zur Messung des Leerwertes verwendet. Das A260/A280-Verhältnis muss im Bereich von 1,9 bis 2,1 liegen, während das A260/A230-Verhältnis im Bereich von 1,8 bis 2,3 liegen muss.

Für die fluorometrische Quantifizierung der RNA kann das Qubit™ Fluorometer entweder mit dem Qubit™ RNA HS Assay-Kit oder dem Qubit™ RNA BR Assay-Kit verwendet werden.

Zur Verwendung mit dem Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit verdünnen Sie die RNA-Proben auf eine optimale Konzentration für die anschließende Transkription in cDNA. Bereiten Sie die Verdünnung vor der Verwendung frisch zu. Verwenden Sie nuklease-freies Wasser als Verdünnungsmittel.

HINWEIS



Die Inputmenge für die cDNA-Synthese ist den Angaben des Herstellers des Transkriptionskits zu entnehmen. Die Verwendung von 100 ng - 1 µg RNA in einem endgültigen Reaktionsvolumen von 20 µL für die cDNA-Synthese ist für beide Probentypen validiert. Wir empfehlen für eine optimale Verwendung einen Input von **500 ng für Knochenmark** und **1 µg für peripheres Blut**.

RNA-Lagerung

Die RNA kann unverdünnt in RNase-freiem Wasser bei -25 °C bis -15 °C bis zu 24 Stunden oder bei -85 °C bis -70 °C bis zu einem Jahr gelagert werden.

cDNA Synthese

Führen Sie die cDNA-Synthese gemäß den Anweisungen des Herstellers mit einem der folgenden Kits durch:

- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific)
- SuperScript™ IV First Strand cDNA-Synthese-System* (Thermo Fisher Scientific)

*empfohlen bei geringer RNA-Menge

HINWEIS



Eine **Hitzeinaktivierung** der reversen Transkriptase ist entscheidend für die PCR-Leistung. Einzelheiten entnehmen Sie bitte den Anweisungen des Herstellers.

cDNA Lagerung

Lagern Sie die cDNA-Proben für bis zu einem Jahr bei -25 °C bis -15 °C.

Vorbereitung der Kontrollproben

Positivkontrolle (PC)

Tauen Sie die Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control auf, homogenisieren Sie sie durch Vortexen, gefolgt von einer kurzen Zentrifugation.

Verdünnen Sie die Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control **1:5** mit dem im Kit enthaltenen Nuclease-Free Water. Mischen Sie z. B. 1 µL der Positivkontrolle mit 4 µL Nuclease-Free Water.

Homogenisieren Sie die verdünnte PC durch kurzes Vortexen und anschließendes kurzes zentrifugieren (ca. 5 s). Bewahren Sie die verdünnte Positivkontrolle nicht auf.

HINWEIS



Verwenden Sie immer eine frische Verdünnung der Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control.

No Template Control (NTC)

Verwenden Sie das im Kit enthaltene Nuclease-Free Water als No Template Kontrolle (NTC) anstelle einer Probe.

Mastermix Ansatz

Nutzen Sie die folgenden Komponenten aus dem Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit für die Vorbereitung des Master Mix:

- Nuclease-Free Water (hellblauer Deckel)
- Reaction Mix A (violetter Deckel)
- Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix (roter Deckel)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (weißer Deckel)

Alle gefrorenen Komponenten werden bei Raumtemperatur (22 °C bis 25 °C, ca. 30 min, lichtgeschützt) aufgetaut und durch Umdrehen der Röhrchen,

Pipettieren oder leichtes Vortexen homogenisiert. Danach werden die Reagenzien kurz zentrifugiert (ca. 5 s). Es wird empfohlen, die Multi Taq 2 DNA Polymerase vor der Herstellung des Mastermixes so lange wie möglich in einer gekühlten Umgebung aufzubewahren (z. B. auf einer Kühlvorrichtung).

HINWEIS

Mischen Sie die Multi Taq 2 DNA Polymerase durch Schwenken, um eine längere Stabilität zu erreichen - **vortexten Sie das Enzym nicht.**

Bereiten Sie den PCR-Mastermix gemäß Tabelle 4 in einem Mikrozentrifugenröhrchen geeigneter Größe für die Gesamtzahl der zu testenden Proben in einem dafür vorgesehenen sauberen Bereich vor. Beziehen Sie jeweils mindestens eine Reaktion für die PC und für die NTC in Ihre Berechnung ein.

HINWEIS

Als Richtwert gilt: Wenn Sie weniger als 10 Proben testen, verwenden Sie genug Mastermix für eine zusätzliche Probe. Wenn Sie 10 oder mehr Proben testen, verwenden Sie ein überschüssiges Mastermixvolumen von +10 %.

Tabelle 4 PCR Mastermix Ansatz

Komponente	Volumen je Reaktionszahl		
	# 1	# 5	# 10
Nuclease-Free Water*	16,1 µL	80,5 µL	161,0 µL
Reaction Mix A	5,0 µL	25,0 µL	50,0 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Primer Mix	2,5 µL	12,5 µL	25,0 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	0,4 µL	2,0 µL	4,0 µL
cDNA-Template oder Kontrollprobe*	1,0 µL	5 x 1,0 µL	10 x 1,0 µL
Gesamtvolumen	25,0 µL	125,0 µL	250,0 µL

*Die Templatemenge kann auf 2 µL erhöht werden, dazu muss das Volumen des Nuclease-Free Wassers angepasst werden.

Mischen Sie den Mastermix durch leichtes Vortexen und zentrifugieren Sie die Mischung anschließend kurz.

Aliquotieren Sie 24,0 µL des PCR-Mastermixes in vorbereitete 200 µL PCR-Gefäße und zentrifugieren Sie die geschlossenen Gefäße kurz.

cDNA-Templates und Kontrollen

Geben Sie 1,0 µL der folgenden Probenarten in die vorbereiteten PCR-Gefäße mit dem PCR-Mastermix.

NTC: 1,0 µL Nuclease-Free Water anstelle einer Probe hinzufügen.

Probe: 1,0 µL der unverdünnten cDNA-Proben hinzufügen.

PC: 1,0 µL der vorbereiteten, 1:5 verdünnten Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control anstelle einer Probe zugeben.

HINWEIS



Bereiten Sie zunächst die NTC vor, um Kontaminationen der Kontrolle zu vermeiden. Bereiten Sie die PC als letztes vor, um Kreuzkontaminationen zu den Proben zu vermeiden.

HINWEIS



Verwenden Sie pro PCR mindestens eine Positivkontrolle (PC) und eine No Template Kontrolle (NTC). Andernfalls kann der Lauf nicht validiert werden.

Alle PCR-Gefäße verschließen, vorsichtig vortexen und abzentrifugieren.

PCR-Amplifikation

Programmieren Sie den PCR-Cycler mit dem folgenden Protokoll (siehe Tabelle 5) und stellen Sie die Heiz- und Kühlraten (Ramping) auf 4 °C/s ein. Führen Sie eine "Hot Start"-PCR durch, um die Polymerase zu aktivieren und die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte zu vermeiden.

HINWEIS



Die Verwendung kalibrierter und gut gewarteter PCR-Cycler ist von entscheidender Bedeutung, da sich Abweichungen negativ auf die Amplifikation sensitiver Targets, wie z. B. KMT2A::MLLT4 auswirken können.

Tabelle 5 PCR-Protokoll

Temperatur	Zeit	
96 °C	4 min	(Hotstart zur Aktivierung der Polymerase)
96 °C	30 s	
60 °C	120 s	25 Zyklen
72 °C	75 s	
68 °C	10 min*	
10 °C	∞	halten

* Wird eine höhere Anzahl von Minus-Adenin-Peaks (-1 bp) beobachtet, ist eine Verlängerung auf bis zu 60 Minuten möglich.

HINWEIS



Bei Thermocyclern muss auf eine Heiz- und Kühlrate von **4 °C/s** geachtet werden, um eine optimale Kitbalance zu gewährleisten.

HINWEIS



Grundlegende Informationen zur Einrichtung, Programmierung und Wartung der verschiedenen PCR-Cycler entnehmen Sie bitte dem Benutzerhandbuch des jeweiligen Geräts.

Kapillargelelektrophorese

Vorbereitung der PCR-Produkte

Nach Abschluss der PCR nehmen Sie die Proben aus dem Cycler und zentrifugieren sie kurz.

HINWEIS

i

Nach Abschluss der PCR können die PCR-Produkte bis zu 4 Wochen bei 2 °C bis 8 °C oder langfristig bei -25 °C bis -15 °C lichtgeschützt gelagert werden.

Tauen Sie folgende Reagenzien auf, gefolgt von leichtem vortexen und zentrifugieren:

- Hi-Di™ Formamid (nicht im Kit enthalten)
- Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder (grüner Deckel)
- DNA Size Standard BTO (550) (orangefarbener Deckel)

Bereiten Sie die Denaturierungsmischung wie in Tabelle 6 beschrieben vor und fügen Sie eine oder zwei Reaktionen hinzu, um Pipettierschwankungen auszugleichen. Fügen Sie eine zusätzliche Reaktion für die Allelleiter hinzu.

Tabelle 6 Denaturierungsmischung

Komponente	Volumen pro Reaktion
Hi-Di™ Formamid	12,0 µL
DNA Size Standard BTO (550)	0,5 µL

Pipettieren Sie 12,0 µL der Denaturierungsmischung in die Wells einer PCR-Platte (geeignet für die Verwendung im Genanalysator).

Geben Sie entweder 1,0 µL PCR-Produkt oder 1,0 µL Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder in die Wells hinzu. Die PCR-Platte mit einer geeigneten Folie verschließen, vortexen und die Platte kurz zentrifugieren.

HINWEIS



Die Allelleiter wird verwendet, um die bei der Datenanalyse analysierten Fragmente korrekt zuzuordnen. In jedem Fragmentlängenanalyseauf muss die Allelleiter mindestens einmal analysiert werden, um eine erfolgreiche Datenanalyse zu gewährleisten.

HINWEIS



Die Kapillaren des Gelelektrophoresegeräts dürfen niemals trocken laufen. Wenn die Proben nicht alle Kapillarpositionen besetzen, füllen Sie die zusätzlichen Wells der Platte mit 12,0 µL Hi-Di™ Formamid entsprechend der Kapillaranzahl.

Hitze-denaturieren Sie die vorbereiteten PCR-Produkte auf einem PCR-Cycler für 3 Minuten bei 95 °C und kühlen Sie die Proben anschließend im Cycler auf 4 °C ab. Zentrifugieren Sie die Proben vor der Fragmentlängenanalyse kurz ab.

Fragmentlängenanalyse

Vor der ersten Fragmentlängenanalyse wird mit dem **Matrix Standard BT5 multi** (BIOTYPE GmbH) ein spektraler Abgleich der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe für das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit (6-FAM™, BTG, BTY, BTO) durchgeführt.

HINWEIS



Für die Installation des Matrix Standard BT5 multi ist die Gebrauchsanweisung zu beachten. Diese ist unter www.biotype.de/en/ifus oder auf Anfrage über support@biotype.de bei der BIOTYPE GmbH erhältlich.

Nachdem der Matrix Standard BT5 multi erfolgreich ausgeführt wurde, importieren Sie die mitgelieferten Geräteeinstellungen für den 3500 Genetic Analyzer wie in Tabelle 7 beschrieben (www.biotype.de/en/template-files).

Tabelle 7 bereitgestellte Dateien für den 3500 Genetic Analyzer
(www.biotype.de/en/template-files)

3500 Series Genetic Analyzers	
Instrument Protocol	<u>POP-4™, 36 cm capillary array:</u> AMLplexIVD_Instrument436.xml
Size Standard Protocol	<u>POP-7™, 50 cm capillary array:</u> AMLplexIVD_Instrument750.xml
Sizecalling Protocol	BTO_60-550_SizeStandard3500.xml
Assay	<u>POP-4™, 36 cm capillary array:</u> AMLplexIVD_Assay436.xml <u>POP-7™, 50 cm capillary array:</u> AMLplexIVD_Assay750.xml

Die Spezifikationen für das erforderliche Geräteprotokoll sind in Tabelle 7 beschrieben. Nur die beschriebenen Parameter sollen angepasst werden, die anderen Parameter bleiben in der Standardeinstellung. Folgen Sie den Anweisungen aus dem Handbuch des Geräteherstellers, um die spezifischen Betriebsparameter einzustellen.

Tabelle 8 Parameter für die Laufmodule der verschiedenen Kapillargel-Elektrophoresegeräte

	Injection Voltage [kV]	Injection Time [s]	Run Voltage [kV]	Run Time [s]
3500 Series Genetic Analyzer	3.0	8	36 cm Capillary Array: 15 50 cm Capillary Array: 19.5	1560
SeqStudio™ Genetic Analyzer	1.2	10	9	1560

Abweichend von den Werten in Tabelle 8 kann die Laufzeit (Run Time) angepasst werden. Es müssen alle Fragmente (60 - 550 bp) des DNA Size Standard 550 (BTO) analysiert werden.

Um ein Größenstandardprotokoll einzurichten, müssen dem orangenen Panel die folgenden Größen für den DNA Size Standard 550 (BTO) zugewiesen werden:

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 und 550 bp.

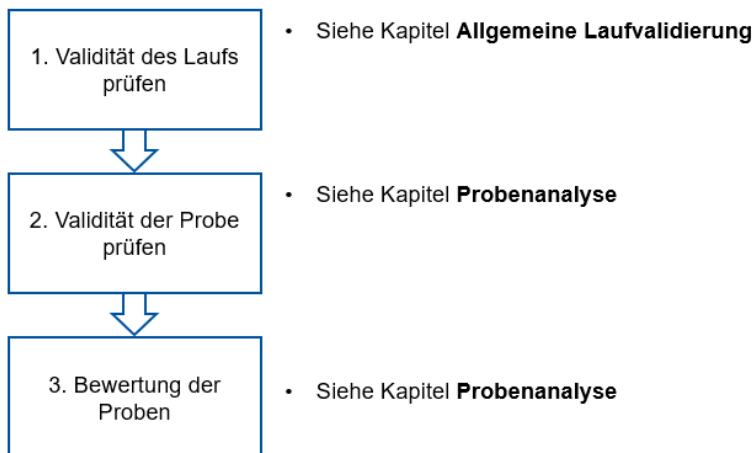
HINWEIS



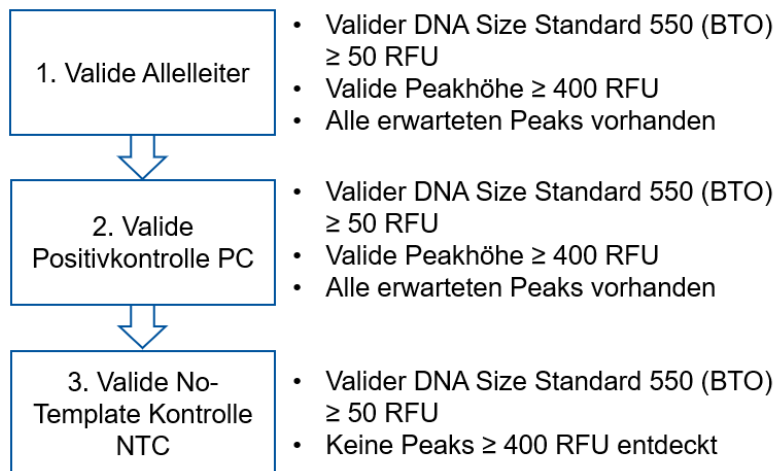
Die BIOTYPE GmbH stellt spezifische Templates für die einfache Installation spezifischer Laufeinstellungen für die Fragmentlängenanalyse sowie Analyse-Templates für ein einfaches Software-Setup des GeneMapper™ ID-X zur Verfügung. Diese Templates stehen zum Download bereit unter: www.biotype.de/en/template-files

Datenanalyse

Allgemeines Verfahren für die Datenanalyse



Allgemeine Laufvalidierung



HINWEIS



Zur Beurteilung der Validität sollte der Messbereich 50 bp – 560 bp analysiert werden.

DNA Size Standard 550 (BTO)

Die Ermittlung der genauen Länge der amplifizierten Produkte hängt vom Gerätetyp, den Elektrophoresebedingungen und dem verwendeten DNA-Größenstandard ab. Aufgrund der Komplexität einiger Targets sollte die Größenbestimmung auf gleichmäßig verteilten Referenzen beruhen.

Überprüfen Sie den DNA Size Standard 550 (BTO) in allen Proben auf die folgenden Kriterien:

- Vorhandensein aller Fragmente bei: **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 und 550 bp** (siehe [Abbildung 1](#))
- Alle Fragmente sind mit Peakhöhen über dem Cut-off ≥ 50 RFU vorhanden
- Bestimmungsmaß $R^2 > 0,995$
(siehe Size Match Editor von GeneMapper™ ID-X)

- Die Peakhöhe der Fragmente nimmt mit zunehmender Fragmentlänge nicht kontinuierlich ab.

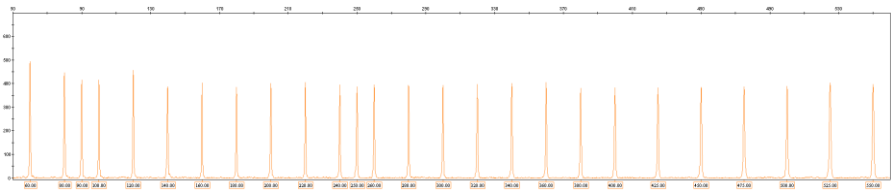


Abbildung 1 Elektropherogramm des DNA Size Standard 550 (BTO), Fragmente mit Längen in bp

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder

Nachdem die Validität des Größenstandards sichergestellt wurde, ist zu prüfen, ob alle in der Allelleiter verfügbaren Peaks mit Peakhöhen über dem Cut-off (≥ 400 RFU) vorhanden sind.

HINWEIS



Die Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder enthält einen Peak für jedes detektierbare Target. Bitte vergleichen Sie die Allele mit der Abbildung 2.

Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control (PC)

Nachdem die Validität des Größenstandards sichergestellt haben, ist zu prüfen, ob alle spezifischen Peaks für die PC mit ≥ 400 RFU vorhanden sind

Die Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control, als Teil des Testkits, repräsentiert die folgenden Targets (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9 Kontrollpeaks in Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control

Panel	Kontrollpeak
Blau	▪ QS-Control ▪ BCR::ABL_b2a3 ▪ RUNX1::RUNX1T1 ▪ ABL-Control

Panel	Kontrollpeak
Grün	▪ KMT2A-PTD_e11e3
Gelb	▪ PML::RARA_bcr3

HINWEIS



Die Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control enthält mindestens einen Peak für jedes verwendete Panel. Bitte vergleichen Sie die Allele mit Abbildung 3 im Anhang.

No Template Control NTC

Nachdem die Validität des Größenstandards sichergestellt wurde, überprüfen Sie, dass in der NTC keine Peaks über dem Cut-off-Wert **≥ 400 RFU** detektiert werden (siehe Abbildung 4 im Anhang).

HINWEIS



Wenn Sie GeneMapper™ ID-X zusammen mit den verfügbaren Templates für die Analysemethode verwenden, werden Peaks < 400 RFU der Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit Proben automatisch nicht mit dem Allelnamen versehen, was Ihnen die Auswertung der NTC erleichtert.

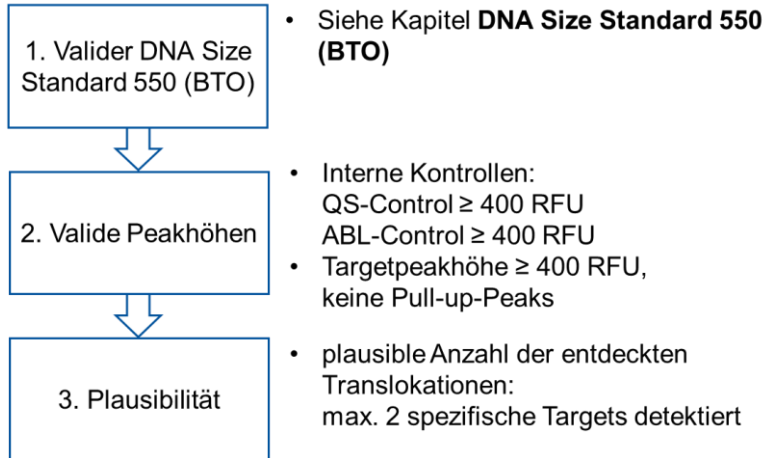
HINWEIS



Artefakte wie kleine Dyeblobs können innerhalb der NTC verstärkt auftreten. Aufgrund der breiten Peakbasis, der abnormalen Peakform und der fehlenden Peakzuordnung ist eine Unterscheidung von Amplikonpeaks möglich.

Probenanalyse

Ablauf der Datenanalyse



HINWEIS



Wenn mehrere Targets den Grenzwert überschreiten oder wenn Sie auf Unklarheiten stoßen, prüfen Sie bitte das Kapitel Troubleshooting (z. B. für eine Liste bekannter Signalkombinationen) oder wenden Sie sich an den Kundensupport unter support@biotype.de.

Mit der GeneMapper™ ID-X Software und den spezifischen Templates der BIOTYPE GmbH wird die Basisvalidierung automatisch durchgeführt.

Nach der Überprüfung des Laufs und der Probenvalidität müssen die Proben ausgewertet werden.

HINWEIS



Der Mentype® AMLplex^{QS} ist ein **ausschließlich qualitativer Test**. Diese Anwendung eignet sich nicht zur Quantifizierung von Kopienzahlen oder zur Überwachung der minimalen Resterkrankung (MRD).

Bei Verwendung der Analyse-Templates von der BIOTYPE GmbH und nach erfolgreicher Auswertung der Allelleiter werden die detektierten PCR-Fragmente automatisch benannt. Eine Übersicht über die Fragmentlängen der PCR-Produkte finden Sie in der folgenden Tabelle 10.

Tabelle 10 Übersicht über die Fragmentlängen der Translokationen in der Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder auf POP-4™ Polymer. ‡ Zwei

Amplikons für die Variante KMT2A::MLLT3_6A; * Obwohl diese Variante mit dem Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit nachweisbar ist, verhindert die unterschiedliche Länge des Amplikons (ca. 173 bp) eine automatisierte Zuordnung.

Panel/Translokation	Länge [bp]	Panel/Translokation	Länge [bp]
FAM-Panel (Blauer Kanal)		BTG-Panel (Grüner Kanal)	
CBFB::MYH11_TypeG	63	DEK::NUP214	78
CBFB::MYH11_TypeI	66	KMT2A-PTD_e9e3	87
QS-Control	72	KMT2A::MLLT3_6A_S‡	113
BCR::ABL_b2a3	107	KMT2A::MLLT3_6B	190
CBFB::MYH11_TypeJ	141	KMT2A-PTD_e10e3	217
CBFB::MYH11_TypeC	146	KMT2A::ELL_e10e3	241
CBFB::MYH11_TypeD	160	KMT2A::MLLT3_7A	245
CBFB::MYH11_TypeH	165	KMT2A::ELL_e10e2	289
CBFB::MYH11_TypeF	175	KMT2A::MLLT4	303
BCR::ABL_b3a3	183	KMT2A-PTD_e11e3	332
BCR::ABL_e1a3	206	KMT2A::MLLT3_8A	359
MLLT10_240::PICALM_2092	265	KMT2A::MLLT3_6A_L‡	497
CBFB::MYH11_TypeA	271	BTY-Panel (Gelber Kanal)	
BCR::ABL_b2a2	282	PML::RARA_bcr1	220
RUNX1::RUNX1T1	301	PML::RARA_bcr3	290
BCR::ABL_b3a2	357	PML::RARA_bcr2*	
CBFB::MYH11_TypeE	366		

Panel/Translokation	Länge [bp]	Panel/Translokation	Länge [bp]
MLLT10_240::PICALM_1987	371		
BCR::ABL_e1a2	380		
NPM1::MLF1	389		
CBFB::MYH11_TypeB	485		
ABL-Control	519		

Datenanalyse mit GeneMapper™ ID-X

Vorbereitung der GeneMapper™ ID-X Software

Allgemeine Hinweise zur Anwendung und Probenanalyse mit dieser Software finden Sie im Benutzerhandbuch der GeneMapper™ ID-X Software. Die Allelzuordnung soll mit der Analysesoftware GeneMapper™ ID-X in Kombination mit den Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit Template Files der BIOTYPE GmbH durchgeführt werden. Die BIOTYPE Template Files (siehe Tabelle 11) sind auf unserer Homepage (www.biotype.de/template-files) als Download oder auf Anfrage über support@biotype.de erhältlich. Der Analyse-Workflow mit der GeneMapper™ ID-X Software ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 11 BIOTYPE GmbH Vorlagen für GeneMapper™ ID-X Software,
Templates spezifisch für ¹POP-1™, ²POP-4™ and ³POP-7™ Polymer

Template	Name der Datei	
Panels*	AMLplexIVD_Panel1_v1x ¹ AMLplexIVD_Panel4_v1x ² AMLplexIVD_Panel7_v1x ³	oder höhere Versionen
BinSets*	AMLplexIVD_Bins1_v1x ¹ AMLplexIVD_Bins4_v1x ² AMLplexIVD_Bins7_v1x ³	oder höhere Versionen
Size Standard*	BTO_60-550_v1x	oder höhere Versionen
Analysis Method*	AMLplexIVD_Analysis1_v1x ¹ AMLplexIVD_Analysis4_v1x ² AMLplexIVD_Analysis7_v1x ³	oder höhere Versionen

Template	Name der Datei
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes
Table Settings	Table for 2 Alleles
	Table for 10 Alleles

*Diese Vorlagen müssen immer für die Datenanalyse verwendet werden. Die anderen Vorlagendateien sind optional.

HINWEIS



Der Import und die Allelzuordnung mit den bereitgestellten Templates ist nur gewährleistet, wenn die GeneMapper™ ID-X Software verwendet wird. Wenn die GeneMapper™ Software verwendet wird, kann es bei einigen Templates zu Importproblemen kommen. Möglicherweise müssen Sie Panels und Bins mit einem oder mehreren Durchläufen der Allelleiter an Ihre spezifische Geräte-Performance anpassen. Kontaktieren Sie uns für Unterstützung (support@biotype.de).

Tabelle 12 Arbeitsablauf der Datenanalyse mit GeneMapper™ ID-X

Nr.	Icon	Arbeitsschritt
1		Vorbereitung der Software
		Panel Manager Importieren Sie die mitgelieferten Template-dateien für Panels Bins und Stutter.
		GeneMapper™ ID-X Manager Importieren Sie die mitgelieferten Templates für Analyse-methode und Größenstandard
2		Probenimport
		Add Samples to Project (Proben zum Projekt hinzufügen) - Durchsuchen Sie den Laufordner, wählen Sie ihn aus und Add to List → Add .
3		Probenanalyse

Nr.	Icon	Arbeitsschritt										
		Markieren Sie die folgenden Eigenschaften in den entsprechenden Spalten des Probenblatts und wählen Sie Analyze										
		<table><tr><th>Spaltenname</th><th>Wählen Sie</th></tr><tr><td>Sample Type</td><td>Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control oder Sample</td></tr><tr><td>Analysis Method</td><td>Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE Template AMLplexIVD_Analysis_v1x</td></tr><tr><td>Panel</td><td>Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE Template AMLplexIVD_Panel_v1x</td></tr><tr><td>Size Standard</td><td>Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE Template BTO_60-550_v1x</td></tr></table>	Spaltenname	Wählen Sie	Sample Type	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control oder Sample	Analysis Method	Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE Template AMLplexIVD_Analysis_v1x	Panel	Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE Template AMLplexIVD_Panel_v1x	Size Standard	Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE Template BTO_60-550_v1x
Spaltenname	Wählen Sie											
Sample Type	Allelic Ladder, Positive Control, Negative Control oder Sample											
Analysis Method	Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE Template AMLplexIVD_Analysis_v1x											
Panel	Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE Template AMLplexIVD_Panel_v1x											
Size Standard	Wählen Sie das zuvor importierte BIOTYPE Template BTO_60-550_v1x											
4		Kontrollen überprüfen										
	 	Überprüfung der Validität der Kontrollen (Allelleiter, Positivkontrolle, Negativkontrolle) Bei ausreichenden Peakhöhen erfolgt die Zuordnung entsprechend den Angaben in der Analysemethode.										
5		Beispielhafte Bewertung										
	 	Prüfen Sie die Validität der Probe. Bei ausreichenden Peakhöhen erfolgt die Zuordnung entsprechend den Angaben in der Analysemethode.										

HINWEIS**i**

Unter Verwendung der verfügbaren Templates für die Analysemethode, Bins und Panels und der Auswahl des entsprechenden Probentyps wird die Gültigkeit dieser Proben von der Software automatisch überprüft. Die Qualitätskontrollflags SOS (Sample off-Scale), SQ (Sizing Quality), OMR (Outside Marker Range) müssen bei bestandener Validität grün hinterlegt sein.

ARNM	SOS	SQ	SSPK	MIX	OMR	CGQ
						

HINWEIS**i**

Verwenden Sie den Size Match Editor in GeneMapper™ ID-X, um den Größenstandard zu bewerten. Wenn eine automatische Fragmentzuordnung fehlgeschlagen ist, können die Triplets 80 / 90 / 100 bp und 240 / 250 / 260 bp zur Orientierung bei der manuellen Peakzuweisung verwendet werden.

Troubleshooting

Um eine präzise und zuverlässige Detektion der Zielsequenzen zu gewährleisten, sollte die Post-PCR-Analyse, einschließlich der automatischen Allelzuordnung und -validierung, mit der validierten GeneMapper™ ID-X-Software in Kombination mit den Template Dateien von BIOTYPE durchgeführt werden. Im Falle von Unklarheiten wenden Sie sich bitte an support@biotype.de.

Pull-up-Peaks

Pull-up-Peaks können auftreten, wenn die Peakhöhen außerhalb des linearen Detektionsbereichs liegen oder wenn eine falsche Matrix verwendet wurde. Sie können an den Positionen bestimmter Peaks in anderen Farbpanels erscheinen, typischerweise mit niedrigeren Signalintensitäten. Dieser Effekt sollte bei hohen Amplifikationsprofilen der folgenden Targets berücksichtigt werden:

- PML::RARA_bcr3 (gelber Kanal) verursacht einen Pull-up-Peak in KMT2A::ELL_e10e2 (grüner Kanal)
- RUNX1::RUNX1T1 (blauer Kanal) verursacht einen Pull-up-Peak in KMT2A::MLLT4 (grüner Kanal, nur wenn POP-7™ Polymer verwendet wurde)

Template-unabhängige Addition von Nukleotiden

Aufgrund ihrer terminalen Transferase-Aktivität neigt die Multi Taq 2 DNA Polymerase dazu, ein Adenosin mehr an das 3'-Ende der amplifizierten DNA-Fragmente anzuhängen. Der Artefaktpeak ist eine Base kürzer als erwartet (-1 bp Peaks). Alle BIOTYPE-Primer sind so konzipiert, dass diese Artefakte minimiert werden. Die Artefaktbildung wird durch die optionale Verlängerung des letzten Extensionsschritt des PCR-Protokolls auf 68 °C für 60 min weiter reduziert. Die Peakhöhe des Artefakts korreliert mit der cDNA-Menge. Die Laboratorien sollten ihre individuellen Grenzwerte für die Analyse der Peaks festlegen.

Artefakte

Die Raumtemperatur kann das Laufverhalten von PCR-Produkten auf Multikapillargeräten beeinflussen, und es können Schulterpeaks oder Split-Peaks auftreten. Außerdem kann die automatische Zuordnung in einigen

Fällen beeinflusst werden. Wenn diese Effekte auftreten, empfehlen wir die Probe bei einer höheren Raumtemperatur erneut zu injizieren. Erwägen Sie stets die Verwendung frischer Verbrauchsmaterialien gemäß den Empfehlungen des Herstellers.

Einfluss der Polymere

Das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit wurde für die Analyse auf POP-4TM Polymer validiert und zertifiziert. Die Verwendung anderer Polymere (wie POP-7TM oder POP-1TM) wurde verifiziert, könnte aber das Laufverhalten bestimmter PCR-Produkte beeinflussen. Außerdem könnte das Hintergrundrauschen durch das unterschiedliche Verhalten freier Fluoreszenzfarbstoffe zunehmen.

Pipettierungenauigkeiten

Die Robustheitsanalyse des Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kits hat gezeigt, dass das Kit gegenüber geringen Abweichungen vom beschriebenen Protokoll (+/- 10 % Abweichung) robust ist. Eine mittlere Abweichung (+/- 20 %) vom beschriebenen Protokoll kann für die Analyse kritischer sein. Mittlere Abweichungen von - 20 % bei den PCR-Komponenten sind unbedingt zu beachten, da sie die Signalhöhe deutlich reduzieren. Die empfindlichsten Targets in diesem Zusammenhang sind KMT2A::MLLT4 und DEK::NUP214.

Um etwaige Abweichungen zu minimieren, empfehlen wir die Verwendung kalibrierter Pipetten, präzises Pipettieren und gründliches Mischen.

Niedrige ABL-Kontrollspitzen

Die interne ABL-Kontrolle bildet das längste Amplikon des Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kits und ist daher ein wesentlicher Qualitätskontrollmarker. Im Falle einer niedrigen ABL-Kontrollpeakhöhe ist eine der folgenden Ursachen am wahrscheinlichsten:

Template-Input in der Reaktion zu niedrig: Bitte bestimmen Sie die RNA-Konzentration und erhöhen Sie den cDNA-Synthese-Input nach Bedarf.

Fragmentierte RNA, d. h. kleinere Amplikons von Targets können positiv sein, aber die interne Kontrolle ABL fehlt. Überprüfen Sie den Arbeitsablauf der Probenvorbereitung auf RNase-Kontamination. Es ist bekannt, dass RNA-Fragmentierung in archiviertem Probenmaterial auftreten kann.

Unwirksame cDNA-Synthese: Achten Sie bei der cDNA-Synthese auf die Einhaltung der Herstelleranweisungen. Verwenden Sie eines der validierten cDNA-Synthese-Kits, wie im Kapitel cDNA Synthese beschrieben.

Die Probe wird durch das aktive Enzym Reverse-Transkriptase beeinträchtigt: Befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers und beachten Sie insbesondere den Schritt der Hitzeinaktivierung während der cDNA-Synthese.

Zusätzliche Amplikons oder doppelpositive Ergebnisse

Es wird erwartet, dass die Mehrheit der Patientenproben ein negatives Ergebnis oder ein positives Ergebnis für eine Translokation zeigen. Mehr als eine Translokation ist ein ungewöhnliches Ergebnis und erfordert möglicherweise eine weitere Überprüfung. Einige Kombinationen wurden jedoch bereits in Patientenproben beobachtet, z. B. die folgenden:

Das Target BCR::ABL_b2a3 kann mit relativ geringer Peakhöhe erscheinen, wenn es eine starke Amplifikation für die ABL-Kontrolle oder eine andere Transkriptvariante von BCR::ABL gibt (etwa 5 - 10 % des Hauptergebnisses).

Es ist bekannt, dass die partial tandem duplication (partielle Tandemduplikation) von KMT2A (KMT2A-PTD) gleichzeitig mit anderen Translokationen und in komplexen Rearrangements auftritt, die für mehr als eine KMT2A-PTD Variante positiv erscheinen können.

Bei Verwendung von POP7TM-Polymer kann die Translokation CBFB::MYH11_Type A zu einem unspezifischen Signal für RUNX1::RUNX1T1 und CBFB::MYH11_Type F führen. Der RUNX1::RUNX1T1-Peak wird bei Verwendung von POP4TM-Polymer als Off-Ladder-Peak zugeordnet, was anhand der ME-1-Zelllinie verifiziert werden konnte. Beide unspezifischen Nebenpeaks zeigen eine geringere Peakhöhe im Vergleich zu CBFB::MYH11_Type A. Bei Verwendung von POP7TM-Polymer kann ein unspezifischer Off-Ladder-Peak als Translokation CBFB::MYH11_Type I mit Peakhöhen unter 2000 RFU zugeordnet werden.

Das Target KMT2A::MLLT4 tritt mit zwei unterschiedlichen Amplikonlängen auf, abhängig von der probenspezifischen Prävalenz der Transkriptvarianten. Die meisten Patientenproben zeigen beide Amplikons mit einem Längenunterschied von drei Nukleotiden als Doppelpeak im

KMT2A::MLLT4-Target Bin. Dies ist ein valides Ergebnis, für das keine weiteren Maßnahmen erforderlich sind.

Jede KMT2A-Translokation kann mit dem Bruchpunkt in Exon 9 (am häufigsten) oder Exon 10 und 11 (selten) auftreten. Jeder starke Off-Ladder-Peak im grünen Kanal kann von einer atypischen KMT2A-Translokation herrühren und kann mit anderen Methoden überprüft werden.

Die KMT2A::MLLT3-Transkriptvariante 6A kann bei sehr hohem Input und sehr hoher RNA-Qualität zwei nachweisbare Amplikons erzeugen, die entsprechenden Peaks sind 6A_S (short, erforderlich) und 6A_L (long, optional). Dies ist ein notwendiges Phänomen, das dem Primerdesign des Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit inhärent ist. Dies ist ein valides Ergebnis, es sind keine weiteren Maßnahmen erforderlich.

Ein Off-Ladder-Peak im gelben Kanal zwischen den Bins von PML::RARA_bcr1 und _bcr3 wird wahrscheinlich durch eine Variante von PML::RARA_bcr2 verursacht. Dieses Target hat mehrere Bruchstellen im PML-Exon 6 und kann daher keinen spezifischen Bins zugeordnet werden.

Leistungsbewertung

Analytische Sensitivität

Der Probentyp des Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kits ist definiert als cDNA, die aus zellulärer RNA transkribiert wird, welche aus peripherem venösen Vollblut oder Knochenmarkaspirat isoliert wurde. Bei Blutproben ist RNA im Bereich von 50 ng bis 1000 ng mit ausreichender Peakhöhe der ABL-Kontrolle unter Verwendung der während dieser Leistungsbewertung validierten cDNA-Synthesekits SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) und High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) messbar. Unter der Annahme einer 100 %igen Transkriptionseffizienz ergibt sich ein theoretischer cDNA-Konzentrationsbereich von 2,5 ng/μL bis 50 ng/μL; 1 μL cDNA wird in der PCR-Reaktion verwendet. Bei Knochenmarksproben ist RNA im Bereich von 50 ng bis 1000 ng mit dem SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) und von 100 ng bis 1000 ng mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) mit ausreichender Peakhöhe der ABL-Kontrolle messbar. Unter der Annahme

einer 100 %igen Transkriptionseffizienz ergibt sich ein theoretischer cDNA-Konzentrationsbereich von 2,5 ng/μL bzw. 5 ng/μL bis 50 ng/μL; 1 μL cDNA wird in der PCR-Reaktion verwendet. Der optimale RNA-Input ist definiert als 1000 ng für periphere Vollblutproben und 500 ng für Knochenmarksproben. Bei Proben mit geringer RNA-Konzentration oder kritischen Targets kann der cDNA-Input in der PCR auf bis zu 4 μL für cDNA erhöht werden, die mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) transkribiert wurde, unabhängig vom Probenotyp. Für cDNA, die mit dem SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) transkribiert wurde, ist der cDNA-Input auf maximal 2 μL begrenzt.

Der Limit of Blank (LoB) wurde an 12 Proben unterschiedlicher Herkunft mit der zuvor festgelegten optimalen Einsatzmenge getestet. Da in keiner der 12 getesteten Proben unspezifische Peaks oberhalb des Schwellenwerts von 400 RFU Peakhöhe im Bereich von 55 bp bis 550 bp festgestellt wurden, kann ein Schwellenwert von 400 RFU festgelegt werden.

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) des Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kits wurde mit 6 synthetischen Proben mit cDNA-Hintergrund getestet, wobei alle Primerpaare im Primermix abgedeckt wurden. Bei Primerpaare, die mehr als ein Target amplifizieren wurde die längste und daher am schwierigsten nachzuweisende Transkriptvariante gewählt.

Das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit zeigte mit einem LoD von maximal 400 Kopien für die getesteten Targets (siehe Tabelle 13) ein akzeptables Limit of Detection gemäß den Akzeptanzkriterien, mit Ausnahme von KMT2A::MLLT4, für das ein akzeptables Ergebnis mit einer LoD von 1000 Kopien erzielt wurde. Da nicht alle Transkriptvarianten der nachgewiesenen Genfusionen getestet wurden, wird ein Gesamt-LoD von 1000 Kopien, der das höchste Ergebnis der getesteten Targets war, als sicher anwendbar angenommen.

Tabelle 13 LoD für das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit.

Probe	Target	LoD [Kopien]
Probe 1	CBFB::MYH11_TypeJ	200
	BCR::ABL_e1a2	200
	CBFB::MYH11_TypeB	200
	KMT2A-PTD_e11e3	200
	PML::RARA_bcr1	400
Probe 2	CBFB::MYH11_TypeC	200
	CBFB::MYH11_TypeA	100
	NPM1::MLF1	200
	KMT2A::MLLT3_6A_S	100
	KMT2A::MLLT3_6A_L	200
	PML::RARA_bcr3	200
Probe 3	CBFB::MYH11_TypeG	200
	BCR::ABL_b2a3	100
	CBFB::MYH11_TypeE	200
	KMT2A::ELL_e10e3	100
Probe 4	CBFB::MYH11_TypeI	200
	MLLT10_240::PICALM_2092	200
	RUNX1::RUNX1T1	400
	DEK::NUP214	200
Probe 5	KMT2A::MLLT4 (short)	1000
Probe 6	KMT2A::MLLT4 (short)	500
	KMT2A::MLLT4 (long)	500

Da es sich bei dem Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit um einen qualitativen Assay handelt, mit dem das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein des Zielanalyten bestimmt werden soll, wird die Prüfung der Quantifizierungsgrenze (Limit of Quantitation, LoQ) für die beschriebene Zweckbestimmung als nicht relevant angesehen.

Analytische Spezifität

Es wurde die automatische Allelzuweisung mit der Allelleiter und die Konkordanz der Allelzuordnung im Vergleich zu Proben mit synthetischer DNA der Translokationsziele mit der GeneMapper™ ID-X Software geprüft. Anhand der Ergebnisse werden die assayspezifischen Geräteeinstellungen für die Genotypisierung mittels Kapillargelelektrophorese (Bins und Panels) des Genanalysators definiert.

Die PCR-Primer sind so konzipiert, dass sie komplementär zur offiziellen Referenz- Sequenz des menschlichen Genoms binden. Genetische Varianten wie Single Nucleotide Polymorphism (SNPs, INDELs oder Deletionen) können die spezifische Primerbindung beeinflussen und wurden anhand der für das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit relevanten Einträge in der dbSNP überprüft. Ein Eintrag (rs73504425) führt zu einem Verlust der Primerfunktion. Das variante Allel kommt in 0,6 % der afrikanischen Bevölkerung vor und befindet sich innerhalb der Primer-Bindungsstelle für PICALM::MLLT10, einem selten gemeldeten Fusionsgen mit einer Prävalenz von < 1 %.

Darüber hinaus wurde eine BLAST-Suche im menschlichen Transkriptom für den Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix durchgeführt und ergab keine unspezifischen Amplifikationsprodukte im Bereich von 0 – 600 bp.

Genauigkeit und Wahrhaftigkeit

Die analytische Genauigkeit des Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kits basiert auf den Ergebnissen von Richtigkeitsprüfungen des Kits. Die BIOTYPE GmbH nimmt seit 2013 aktiv an einem External Quality Assessment (EQA) Programm teil. Das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer Translokation in den Proben wird durch den Konsens der Ergebnisse aller Teilnehmer dieser EQA bestimmt. Insgesamt wurden seit 2013 68 Proben analysiert.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde eine Kontingenzmatrix erstellt, die auf dem Vergleich der Ergebnisse des Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kits (positiv/negativ) mit den echten Ergebnissen (positiv/negativ) basiert und durch den Konsens aller Teilnehmer des External Quality Assessments bestätigt wurde. Gemäß CLSI EP12 (3rd

edition) wurden die in Tabelle 14 dargestellten Leistungskennzahlen auf der Grundlage einer Kontingenzmatrix berechnet.

Tabelle 14 Analytische Merkmale des Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kits.

Analytisches Merkmal	Schätzung	Unteres 95 % Konfidenz- intervall	Oberes 95 % Konfidenz- intervall
Analytische Sensitivität	92,2 %	81,5 %	96,9 %
Analytische Spezifität	94,1 %	73,0 %	99,0 %
Positiver prädiktiver Wert	97,9 %	89,1 %	99,6 %
Negativer prädiktiver Wert	80,0 %	58,4 %	91,9 %
Genauigkeit	92,6 %	83,9 %	96,8 %

Diese Berechnungen liefern ein umfassendes Maß für die Fähigkeit des Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kits, positive und negative Fälle mit 92 % bzw. 94 % Wahrscheinlichkeit korrekt zu klassifizieren. Der Gesamtanteil der korrekten Ergebnisse liegt bei 93 %, was eine hohe Zuverlässigkeit zeigt. Das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit zeigt eine hohe analytische Leistung, die die Effektivität und Zuverlässigkeit des Assays bestätigt.

Präzision

Wir haben die Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit des Assays auf der Grundlage der ISO 5725-2:2022-05 und der CLSI EP05 (3rd edition) bewertet. Fünf Proben mit synthetischer DNA und die Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control wurden in einer 5 x 5 x 3 (Tag x Replikat x Standort) Multisite-Studie ausgewertet. Die Multisite-Studie untersucht die Hauptschwankungsquellen (Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit), die auf die verschiedenen Teststandorte zurückzuführen ist, an denen unterschiedliche Operatoren mit unterschiedlichen Geräten messen. Die resultierende Wiederholbarkeit lag zwischen 8,3 %CV und 15,6 %CV und die Reproduzierbarkeit zwischen 14,6 %CV und 30,5 %CV. Insgesamt zeigt das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit eine akzeptable Präzision

mit $SD_{(Rep)} \leq 2500$ RFU für alle spezifischen Genfusionen, die mit den Proben mit synthetischer DNA 1 bis 5 und für die Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control getestet wurden.

Grenzwert für die Analyse (Assay Cut-Off)

Das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit verwendet den qualitativen Nachweis von Genfusionen durch Endpunkt-PCR. Daher ist einer der relevanten Cut-offs für den Assay die minimale Peakhöhe, die eine sichere Unterscheidung zwischen technischem Hintergrundrauschen und echter Targeterkennung ermöglicht. Der Cut-off (Peakhöhe in RFU) wurde anhand von Daten aus dem analytischen Sensitivitätstest auf 400 RFU festgelegt.

Interferenzen und Kreuzreaktionen

Potenzielle Störfaktoren, die die Ergebnisse des Messverfahrens beeinflussen könnten, wurden in Übereinstimmung mit den Empfehlungen der CLSI-Leitlinien EP07 (3rd edition) und EP37 (1st edition) bewertet. Für das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit wurden die endogenen und exogenen Interferenzen bestimmt, deren maximal zu erwartende Konzentration (C_{max}) in der PCR-Reaktion und wie in den Richtlinien vorgeschlagen, getestet. Bei beobachteter Interferenz wurden weitere Konzentrationen getestet, bis keine Interferenz mehr nachweisbar war.

Die Ergebnisse zeigten keine störende Wirkung des endogenen Interferents DNA, welche mit 1 ng in der PCR-Reaktion getestet wurde, für den Fall dass der DNA-Verdau als Teil der Probenverarbeitung nicht durchgeführt wurde.

Da für den endogenen Störfaktor Blut eine störende Wirkung bei dem berechneten C_{max} von 0,87 % v/v in der PCR-Reaktion beobachtet wurde, wurden weitere Verdünnungen getestet, bis keine Interferenz mehr nachweisbar war. 0,087 % v/v Blut zeigten keine Interferenz. Eine Blutkontamination kann in der PCR-Reaktion oder in der isolierten RNA-Suspension durch eine orangefarbene Farbverschiebung visuell erkannt werden. Wenn eine Farbveränderung beobachtet wird, empfehlen wir, die RNA-Isolierung zu wiederholen, um eine mögliche Interferenz zu vermeiden.

Bei den exogenen Störfaktoren DTT, RNase-Inhibitor, DNase, Ethanol, Metoclopramid, EDTA, Hydroxyharnstoff und Citrat wurde bei den jeweiligen C_{max} keine Interferenz beobachtet, wobei die für die getesteten Proben

festgestellten Abweichungen von der unbehandelten Gruppe innerhalb der akzeptierten Grenzen lagen.

Bei den exogenen Störfaktoren Reverse Transkriptase, Heparin und Proteinase K wurde eine Interferenz bei den jeweiligen $C_{\max}$ beobachtet, die von CLSI EP37 (1st edition) empfohlen oder berechnet werden. Bei dem Enzym Reverse Transkriptase wurde bei dem getesteten $C_{\max}$ 0,2 % v/v eine Interferenz festgestellt, es sei denn, das Enzym wurde gemäß den Anweisungen der Hersteller der getesteten cDNA-Synthesekits hitzeinaktiviert. Bei Heparin 3,3 U/dL und bei dem Enzym Proteinase K 0,0001 % v/v traten keine Interferenzen auf.

Die Blutantikoagulanzen EDTA, Natriumcitrat und Heparin wurden zusätzlich mit den empfohlenen Isolierungskits getestet. Es wurden keine Auswirkungen auf die analytische Leistung festgestellt. Wir gehen davon aus, dass die Arbeitsabläufe der Isolierungskits alle getesteten Störsubstanzen, die von Antikoagulantien und RNA-Isolierungsreagenzien stammen, wirksam entfernen.

Tabelle 15 Getestete nicht-interferierende Konzentrationen endogener und exogener Störfaktoren

Art der Interferenz	Kategorie	Interferent	Nicht störende geprüfte Konzentration
Endogen	Vollblutbestandteile	Vollblut	0,087 % v/v in der PCR-Reaktion
Exogen	Gerinnungshemmende Mittel	EDTA	0,099 mg/dL
		Zitrat	0,004 % v/v in der PCR-Reaktion
		Heparin	3,3 U/dL
	Reagenzien für die RNA-Isolierung	Proteinase K	0,0001 % v/v in der PCR-Reaktion
		Ethanol	0,3 % v/v in der PCR-Reaktion
		DNase	0,16 % v/v in der PCR-Reaktion
	Reagenzien für die reverse Transkription von cDNA	DTT	0,2 % v/v in der PCR-Reaktion
		RNase-Inhibitor	0,2 % v/v in der PCR-Reaktion

Art der Interferenz	Kategorie	Interferent	Nicht störende geprüfte Konzentration
		Reverse Transkriptase	0,2 % v/v in der PCR-Reaktion (hitzeinaktiviert)
	Antiemetisches Mittel	Metoclopramid	0,225 mg/dL
	Antineoplastisches Mittel	Hydroxyharnstoff	3,08 mg/dL

Stabilität im Gebrauch

Alle Stabilitätsstudien wurden in Übereinstimmung mit ISO 23640:2015 und der CLSI EP25-(2nd edition) Richtlinie geplant. Das folgende Verfahren wurde für alle Stabilitätsstudien durchgeführt: Das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit wurde zu mehreren Zeitpunkten über verschiedene Zeiträume getestet. Es wurden Proben mit synthetischer DNA und die Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control analysiert. Die abschließende Bewertung der verschiedenen Bedingungen umfasste den Vergleich zwischen den Mittelwerten des Startzeitpunkts (T_0) und der nachfolgenden Zeitpunkte (T_n) und wurde anhand der folgenden Gleichung berechnet:

$$abs. \Delta_n = |\bar{x}_{T_0} - \bar{x}_{T_n}|$$

Für die Studie zur Stabilität bei der Verwendung wurden zwei Experimente durchgeführt. Eines zur Prüfung der Stabilität nach mehreren Gefrier- und Auftauzyklen und eines zur Prüfung der Stabilität der Kits während des simulierten Gebrauchs nach dem Öffnen als Teil der Gefrier- und Auftau- sowie der generellen Haltbarkeitsstudie.

Basierend auf den Ergebnissen ist das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit nach dem ersten Öffnen bis zu 24 Monate stabil und kann bis zu 20 Gefrier- und Auftauzyklen überdauern.

Klinische Leistungsdaten

Studiendesign, ethische und regulatorische Aspekte

Das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit und Referenzmethoden wurden an 297 Patientenproben und 10 gesunden Probanden getestet. Ziel dieser Studie war es, einen klinischen Nachweis gemäß §§20 bis 24 des Medizinproduktgesetzes zu erbringen. Mit den Referenzmethoden Zytogenetik (FISH) und/oder intern validierter monoplex-qPCR musste eine Konkordanz mit dem Gerät nachgewiesen werden. Die Bestätigung der zuständigen Ethikkommission lag am 06.06.2012 vor.

Referenzmethoden

Das primäre Ziel ist die Bestimmung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu Referenzmethoden. Als Referenzmethode wurde zum Einen die standardisierte Fluoreszenz-In-Situ-Hybridization (FISH) für eine Auswahl von Translokationen durchgeführt [Grimwade et al. Blood 116: 354-65, 2010]. Translokationen, die zytogenetisch nicht adressierbar sind, wurden zum Anderen mit im Prüflabor etablierten und validierten monoplex-nested-PCR-Tests untersucht [Steudel *et al.* Genes Chromosomes Cancer 37: 237-51, 2003, van Dongen *et al.* Leukemia 13: 1901-28, 1999].

RNA-Extraktion und -Aufreinigung

Mononukleäre Zellen (MNC) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus den Proben gewonnen. Anschließend erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA und die reverse Transkription in cDNA mit handelsüblichen Kits. Die Qualität der cDNA wurde mittels Echtzeit-PCR analysiert. Validierte Einzel-PCR-Assays dienten zur Bestätigung der Fusionsgene und Mutationen.

Ergebnisse

Das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit zeigte keine falsch positiven Ergebnisse mit der getesteten cDNA der 10 gesunden Probanden.

Von 297 getesteten Patientenproben konnten 5 nicht ausgewertet werden, da die interne ABL-Kontrolle unterhalb des empfohlenen Schwellenwerts

nachgewiesen wurde. Von den verbleibenden 292 Proben zeigten 201 im Vergleich zu den Referenzmethoden richtig negative Ergebnisse.

Die einzelnen Ergebnisse der Vergleichstests sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Die Genfusionen PICALM::MLLT10 (CALM-AF10) und KMT2A::MLLT4 (MLL-AF6) konnten im Hinblick auf die diagnostische Sensitivität nicht ausgewertet werden, da keine positiven vorcharakterisierten Proben zur Verfügung standen.

Insgesamt wurde eine diagnostische Sensitivität von 94 % und eine diagnostische Spezifität von 99,5 % erreicht.

Tabelle 16 Schlussfolgerung aus den Ergebnissen der klinischen Leistungsdaten des Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kits.

*Prävalenzdaten wurden aus Grimwade et al. 2010 zitiert. n.e. = nicht bewertet, diagn. = diagnostisch, chrom. = chromosomal

Biomarker				Bewertung der klinischen Leistung (n = 292)					Diagn. Sensitivität [%]	Diagn. Spezifität [%]
Gen-Fusion	Chrom. Aberration	Variante	Prev* [%]	Richtig positiv	Richtig negativ	Falsch-positiv	Falsch negativ			
RUNX1::RUNX1T1	t(8;21)(q22;q22)	n. b.	7	16	275	0	1	94,1	100,0	
BCR::ABL	t(9;22)(q34;q11)	e1a3	1	1	291	0	0	100,0	100,0	
		e1a2								
		b3a2								
		b3a3								
		b2a2								
		b2a3								
PICALM::MLLT10	t(10;11)(p13;q14)	MLLT10_240-PICALM_1987	1	0	292	0	0	n.e.	100,0	
		MLLT10_240-PICALM_2092								
CBFB::MYH11	inv(16)(p13;q22)	Typ A	5	28	262	0	2	93,3	100,0	
		Typ B								
		Typ C								
		Typ D								
		Typ E								
		Typ F								
		Typ G								
		Typ H								
		Typ J								
DEK::NUP214	t(6;9)(p23;q34)	n. b.	1	3	289	0	0	100,0	100,0	
KMT2A::MLLT4	t(6;11)(q27;q23)	n. b.	<0,5	0	292	0	0	n.e.	100,0	
KMT2A::MLLT3	t(9;11)(p22;q23)	6A (6A_S; 6A_L)	1	4	287	0	1	80,0	100,0	
		7A								
		8A								
		6B								
KMT2A::ELL	t(11;19)(q23;p13.1)	e10e2	1	0	290	1	1	0,0	99,7	
		e10e3								

Biomarker					Bewertung der klinischen Leistung (n = 292)				
Gen-Fusion	Chrom. Aberration	Variante	Prev* [%]	Richtig positiv	Richtig negativ	Falsch-positiv	Falsch negativ	Diagn. Sensitivität [%]	Diagn. Spezifität [%]
KMT2A-PTD	Partielle	e9e3	5-7	23	269	0	0	100,0	100,0
	Tandem	e10e3							
	Duplikation	e11e3							
NPM1::MLF1	t(3;5) (q25.1;q34)	n. b.	<0,5	2	290	0	0	100,0	100,0
PML::RARA	t(15;17)	bcr1	13	8	284	0	0	100,0	100,0
	(q22;q21)	bcr2							
		bcr3							
Zusammenfassung			37	85	201	1	5	94,4	99,5

Diagnostische Auswertung

Die klinischen Leistungsmerkmale des Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit zeigten akzeptable Ergebnisse. Die Parameter für die klinische Leistungsbewertung wurden gemäß Anhang I, Abschnitt 9.1b der IVDR (EU) 2017/746 berechnet, wie in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17 Diagnostische Merkmale des Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kits

Diagnostisches Merkmal	Schätzung	Unteres Konfidenzintervall	Oberes Konfidenzintervall
Diagnostische Sensitivität	94,4 %	87,7 %	97,6 %
Diagnostische Spezifität	99,5 %	97,3 %	99,9 %
Positiver prädiktiver Wert	98,8 %	93,7 %	99,8 %
Negativer prädiktiver Wert	97,6 %	94,4 %	99,0 %
Diagnostische Genauigkeit	98,0 %	95,6 %	99,1 %

Qualitätskontrolle

Alle Kitkomponenten durchlaufen bei der BIOTYPE GmbH einen intensiven Qualitätssicherungsprozess. Die Qualität der Testkits wird permanent überwacht, um eine uneingeschränkte Verwendbarkeit zu gewährleisten. Bitte kontaktieren Sie uns, wenn Sie Fragen zur Qualitätssicherung haben.

Technische Unterstützung

Für technische Beratung wenden Sie sich bitte an unser Customer Support Team:

E-Mail: support@biotype.de

Telefon: +49 (0)351 8838 400

Referenzen

Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K, Kamada N (1991)
Etablierung einer menschlichen akuten myeloischen Leukämie-Zelllinie
(Kasumi-1) mit Chromosomentranslokation 8;21. Blood 77(9): 2031-2036.

Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJM, Hokland P, Gabert J (2003)

Bewertung von Kontrollgenen für die Diagnose und den Nachweis von Restkrankheiten bei Leukämiepatienten unter Verwendung der quantitativen Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RQ-PCR) in Echtzeit - ein Programm von Europa gegen den Krebs. Leukämie 17:2474-2486.

Schnittger S, Kinkelin, Schoch U, Heinecke, A, Haase D, Haferlach T, Büchner T, Wörmann B, Hiddemann W & Griesinger F (2000)
Screening auf MLL-Tandemduplikation bei 387 unselektierten Patienten mit AML identifiziert eine prognostisch ungünstige Untergruppe der AML. Leukämie 14, 796-804

Van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Gonzalez Diaz M, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A (1999)
Standardisierte RT-PCR-Analyse von Fusionsgen-Transkripten aus Chromosomenaberrationen bei akuter Leukämie zum Nachweis einer minimalen Resterkrankung - Bericht der BIOMED-1 Konzertierte Aktion: Untersuchung der minimalen Resterkrankung bei akuter Leukämie. Leukämie 13:1901-1928

Nutzungsbeschränkungen

- Die Verfahren in dieser Gebrauchsanweisung müssen wie beschrieben befolgt werden. Jegliche Abweichung kann zum Versagen des Tests oder zu falschen Ergebnissen führen.
- Die Verwendung dieses Produkts ist auf professionelle Laboranwender beschränkt, die speziell in PCR-Techniken und Kapillargelelektrophorese geschult und ausgebildet sind.
- Für die optimale Durchführung dieses Tests sind geeignete Verfahren für die Entnahme, den Transport, die Lagerung und die Verarbeitung der Proben erforderlich.
- Dieser Assay darf nicht direkt an der Probe durchgeführt werden. Vor der Verwendung dieses Assays müssen geeignete Nukleinsäureextraktionsverfahren durchgeführt werden.
- Das Kit wurde ausschließlich für die Verwendung mit den Reagenzien, Geräten und der Software validiert, die in Kapitel Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien beschrieben sind.
- Der Mentype® AMLplex^{QS} wurde als Screening-Tool für die Subtyp-Klassifizierung von AML entwickelt, validiert und zertifiziert. Diese Anwendung eignet sich nicht für die Quantifizierung von Kopienzahlen, wie z. B. die Überwachung der minimalen Resterkrankung (MRD), oder für die Validierung anderer Subtypen von Leukämien oder pädiatrischer AML.
- Aufgrund der genetischen Variabilität können Einzelnukleotid-Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphism, SNPs) oder kurze Insertions-Deletions-Polymorphismen (INDELs) die Wirksamkeit von Primern oder die Zugänglichkeit von Templates beeinträchtigen. Bei einer Analyse der jüngsten Version des menschlichen Genoms (HG38) für alle ethnischen Gruppen wurde nur ein kritischer SNP gefunden, der zu einem Verlust der Primerfunktion führt. Das variante Allel kommt in 0,6 % der afrikanischen Bevölkerung vor und befindet sich in der Primer-Bindungsstelle für PICALM::MLLT10, einem selten gemeldeten Fusionsgen mit einer Prävalenz von < 1 %. Aufgrund der geringen Prävalenz der Genfusion in Kombination mit der geringen Wahrscheinlichkeit des Auftretens des SNP in der Weltbevölkerung ist das Risiko falsch-negativer Ergebnisse jedoch gering. Im Falle von

Unsicherheiten sollten die Ergebnisse mit Referenzmethoden bestätigt werden.

- Um die Leistungsfähigkeit des Kits zu gewährleisten, ist eine gute Laborpraxis erforderlich.
- Die Ergebnisse müssen von einer geschulten medizinischen Fachkraft interpretiert werden.
- Bei der Interpretation der Ergebnisse muss die Möglichkeit falsch negativer und falsch positiver Ergebnisse berücksichtigt werden.
- Verwenden Sie keine abgelaufenen oder falsch gelagerten Komponenten

Informationen zur Bestellung

Richten Sie Ihre Bestellungen per E-Mail an sales@biotype.de.

Produkt	Packungsgröße	Bestellnummer
Mentype® AMLplex ^{QS} PCR Amplification Kit	25 Reaktionen	45-12100-0025
	100 Reaktionen	45-12100-0100
	400 Reaktionen	45-12100-0400
Matrix Standard BT5 multi	1 x 25 µL	45-15100-0025
	2 x 25 µL	45-15100-0050

Markenzeichen und Haftungsausschlüsse

Mentype® ist eine eingetragene Marke der BIOTYPE GmbH.

Andere Marken: ABI PRISM®, GeneMapper®, SuperScript™ GeneAmp® und Applied Biosystems® (Gruppe Applied Biosystems LLC); QIAamp® (Qiagen); POP-4™, POP-1™, POP-7™ (Europa: Applied Biosystems LLC, USA: Life Technologies Corporation). Die PCR ist durch Patente geschützt. Patentinhaber sind Hoffmann-La Roche Inc. und F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Eingetragene Namen, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, sind nicht als gesetzlich ungeschützt zu betrachten.

Das Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit ist ein CE-gekennzeichnetes Diagnostik-Kit gemäß der europäischen In-vitro-Diagnostik-Verordnung (EU) 2017/746.

Das Produkt ist nicht von Health Canada lizenziert und nicht von der FDA genehmigt oder zugelassen.

Nicht in allen Ländern verfügbar.

Ausschließlich zum Zweck der besseren Lesbarkeit wird auf die geschlechtsspezifische Schreibweise sowie auf eine Mehrfachbezeichnung verzichtet. Alle personenbezogenen Bezeichnungen sind somit geschlechtsneutral zu verstehen.

© 2025 BIOTYPE GmbH; alle Rechte vorbehalten.

Erläuterung von Symbolen



Hersteller



Charge



Ausreichend für <N> Prüfungen



Gebrauchsanweisung beachten (eIFU)



Verwendbar bis



Temperaturbegrenzung



Artikelnummer



In-vitro-Diagnostikum



Vom Sonnenlicht schützen



Trocken aufbewahren



Unique device identifier

Weitere in dieser Gebrauchsanweisung verwendete Bezeichnungen:



Nützliche Tipps



Achtung, beachten Sie unbedingt diesen Hinweis!

blau unterstrichener Text

Links, die zu externen Inhalten wie Homepages oder E-Mail-Adressen führen

schwarz unterstrichener Text

Querverweise im Dokument zur einfachen Navigation

eingerückter, kursiver, fetter Text

Felder, die in einer Software angeklickt werden sollen

Anhang

Liste der Zielgene

Gen	Alternative Namen	Transkript-ID
RUNX1	AML1, AMLCR1, CBFA2, PEBP2A2	ENST00000675419.1
RUNX1T1	AML1T1, CBFA2T1, CDR, ETO, MTG8, ZMYND2	ENST00000523629.7
BCR	ALL, BCR1, CML, D22S11, D22S662, PHL	ENST00000305877.13
ABL1	ABL, C-ABL, JTK7, P150	ENST00000318560.6
MLLT10	AF10	ENST00000307729.12
PICALM	CALM, CLTH	ENST00000393346.8
CBFB	PEBP2B	ENST00000412916.7
MYH11	SMHC, SMMHC, SMMS-1	ENST00000300036.6
DEK	D6S231E	ENST00000652689.1
NUP214	CAIN, CAN, D9S46E, N214	ENST00000359428.10
KMT2A	ALL-1, ALL1, CXXC7, HRX, HTRX, HTRX1, MLL, MLL1, MLL1A, TRX1	ENST00000534358.8
MLLT4	AF-6, AF6, AFDN	ENST00000683244.1
MLLT3	AF-9, AF9, YEATS3	ENST00000380338.9
ELL	C19ORF17, ELL1, MEN, PPP1R68	ENST00000262809.9
NPM1	B23, NPM	ENST00000296930.10
MLF1	-	ENST00000466246.7
PML	MYL, RNF71, TRIM19	ENST00000268058.8
RARA	NR1B1, RAR, RAR-ALPHA, RARALPHA	ENST00000254066.10

Elektropherogramme von Referenzproben

Auf den folgenden Seiten finden Sie Beispiele für die Elektropherogramme der Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder (Abbildung 2), der Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control (PC, Abbildung 3) und einer No Template Kontrolle (NTC, Abbildung 4).

Alle Proben wurden auf einem ProFlex PCR Cycler amplifiziert und auf einem 3500 Genetic Analyzer (POP-4™, 36 cm Array) unter Verwendung der validierten Laufparameter analysiert. Die Datenanalyse wurde mit GeneMapper™ ID-X Version 1.6 durchgeführt. Es wurden Bins, Panels und Analysemethoden gemäß Tabelle 11 verwendet.

Die Elektropherogramme sind auf eine Fragmentlänge von 50 - 560 bp (x-Achse) gezoomt. Die Skalierung der y-Achse wurde individuell vorgenommen:

Abbildung 2, Seite 59: Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder:
3.000 RFU

Abbildung 3, Seite 60: Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control:
9.000 RFU

Abbildung 4, Seite 61: No Template Control (NTC): 9.000 RFU

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder

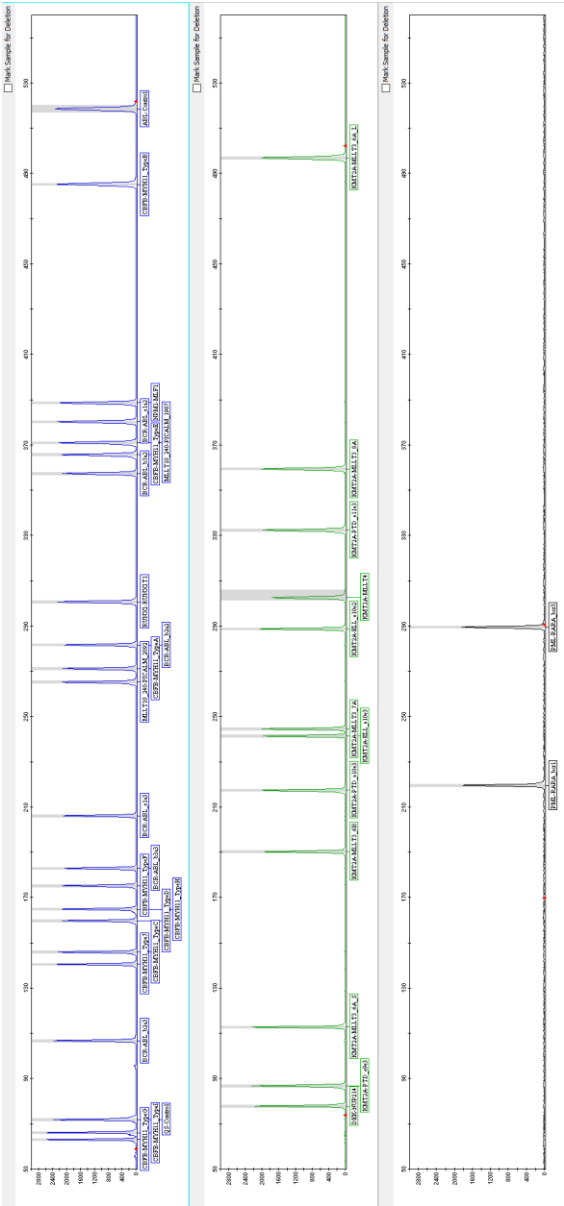


Abbildung 2 Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder

Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control (PC)

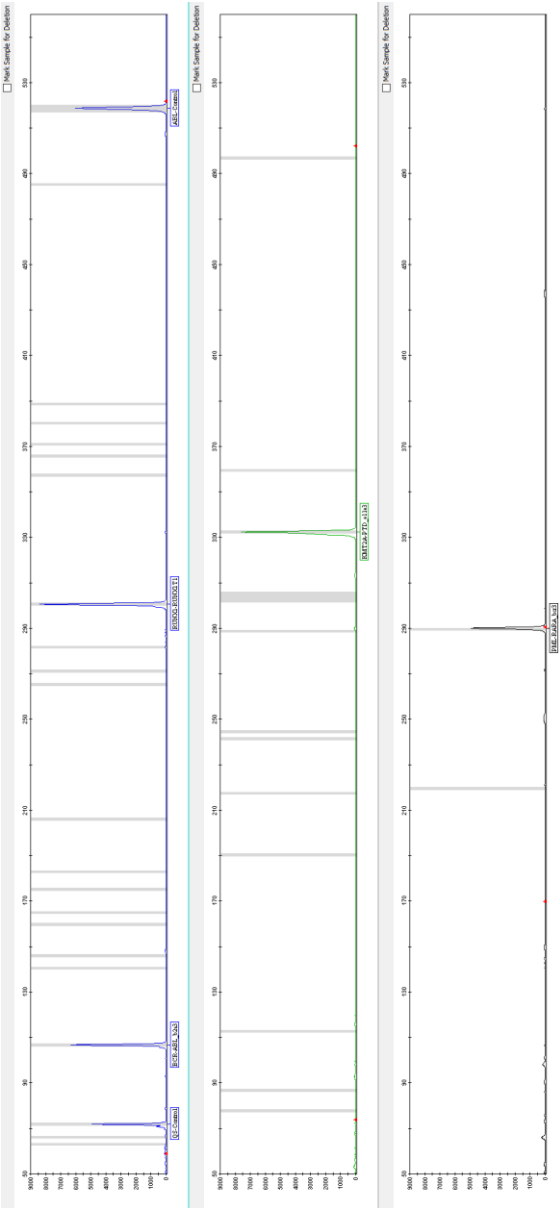


Abbildung 3 Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control (PC)

No Template Control (NTC)

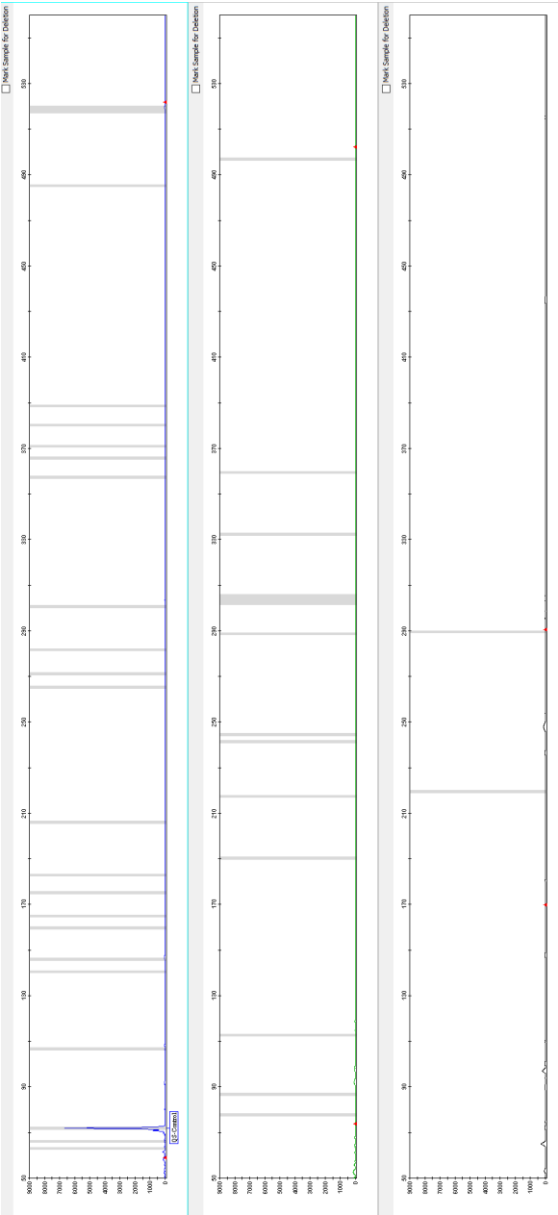


Abbildung 4 No Template Control (NTC)

BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 Dresden

GERMANY

Tel.: +49 351 8838 400

Fax: +49 351 8838 403

www.biotype.de

Bestellung

sales@biotype.de

Kundenservice & Support

support@biotype.de

