

Mentype® AMLplex^{QS}

PCR Amplification Kit

Használati utasítás



0483

In vitro diagnosztikai felhasználásra

AMLIFU02v2hu

2025. 07. 23



45-12100-0025

45-12100-0100

45-12100-0400



Gyártási tétel kódja



BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Weboldal: www.biotype.de

E-mail: support@biotype.de

Rendelés: sales@biotype.de



Módosításról szóló értesítés

Kérjük, vegye figyelembe a használati utasítás korábbi verziójához képest elvégzett következő módosításokat:

Dokumentumkód	Módosítások	Dátum
AMLIFU02v1hu	Előző változat	2025. 05. 28
AMLIFU02v2hu	A 8. táblázat frissítése	2025. 07. 23

A jelen használati utasítás nyomtatott változata 7 napon belül ingyenesen igényelhető.

További kérdéseivel forduljon hozzánk bizalommal:

a +49 351 8838 400-as telefonszámon vagy a support@biotype.de e-mail-címen.

Tartalom

Rendeltetés.....	4
Tudományos háttér	4
Termékleírás.....	5
A készletben megtalálható anyagok	7
A komponensek ismertetése	8
Reagensek tárolása és kezelése	9
Szükséges, de a készletben nem megtalálható anyagok és eszközök . 9	
Általános laboratóriumi berendezések	9
Reagensek, készletek és fogyóeszközök	10
Műszerek és szoftverek	11
Minták és vizsgálati minták	13
Figyelmeztetések és óvintézkedések	13
Értesítés a felhasználó számára	14
Eljárás	15
A kísérleti munkafolyamat áttekintése	15
Minta-előkészítés	15
A kontroll előkészítése	19
Az alapkeverék beállítása	19
PCR-amplifikálás.....	21
Kapilláris gélelektroforézis	23
A PCR-termékek előkészítése	23
Fragmentumhossz-analízis	24
Adatelemzés	26
Általános adatelemzési eljárás.....	26
Mintaelemzés	30
Adatelemzés GeneMapper™ ID-X segítségével	32

Hibaelhárítás	36
A teljesítőképesség értékelése	39
Minőség-ellenőrzés	50
Technikai segítségnyújtás	50
Hivatkozások	50
A felhasználás korlátozása	51
Rendelési információk	52
Védjegyek és felelősséget kizáró nyilatkozatok	53
A szimbólumok magyarázata	54
Függelék	56

Rendeltetés

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit egy manuális vizsgálat, amely 11 génfüzió kvalitatív szűrésére szolgál, összesen 34 transzkripcióz variánssal, lehetővé téve a diagnosztikai, prognosztikai és terápiás jelentőségű kromoszóma-rendellenességek azonosítását akut mieloid leukémiában (AML) szenvedő vagy gyaníthatóan szenvedő felnőtt betegeknél.

A vizsgálatot komplementer DNA (cDNA)-val kell használni, amely reverz módon átíródott a perifériás vénás teljes vérből vagy a csontvelőmintákból kivont celluláris RNA-ból.

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit készülék kromoszóma-rendellenességek kimutatására szolgál az akut mieloid leukémia tekintetében releváns klinikai döntések meghozatalához. A specifikus genetikai transzlokációk azonosítása lehetővé teszi a leukémiás betegségek osztályozását, és alapvető információkat szolgáltat a betegek kockázatorientált terápiájának diagnosztikai indoklására.

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit molekuláris genetikai technikákra, multiplexPCR-re és a Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems divízió) Genetic Analyzer analizátorának kezelésére kiképzett professzionális laboratóriumi felhasználók számára készült.

Tudományos háttér

A specifikus kromoszóma-rendellenességek ellenőrzése magas prognosztikai értéket képvisel az akut leukémia szinte minden típusában. A kromoszóma-rendellenességek (transzlokációk) molekuláris biológiai bizonyítéka fontos diagnosztikai eredményt jelent. A specifikus transzlokációk kimutatása lehetővé teszi a leukémiás betegségek altípusainak osztályozását, és alapvető információkat szolgáltat a betegek kockázatorientált terápiájához.

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit megkönnyíti az AML-ben eddig megfigyelt leggyakoribb kromoszóma-rendellenességek kimutatását, és egy egyszerűen használható, rutinkompatibilis, megbízható szűrési eszközt jelent.

Termékleírás

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit optimalizált reagenseket tartalmaz 11 fúziós gén kvalitatív, nagy felbontású kimutatására, összesen 34 transzkripciósi variánssal (lásd [Táblázat 1](#)). A variánsok elnevezése a korábbi adatok alapján megállapított nomenklatúrákat követi, különösen a következő gén esetében: KMT2A (Schnittger et al., 2000). A gének teljes listája, alternatív nevük és a szisztematikus variánsleírásokhoz használt transzkripciósi azonosítók a függelékben található (lásd: [Célzott gének listája](#)).

A tesztkészlet magában foglal egy belső PCR-kontrollt (Quality Sensor “QS-Control”), azaz egy templátfüggetlen és egy templátfüggő cDNA-kontrollt (ABL-Control), hasznos információkat nyújtva a PCR hatékonyságáról, az alkalmazott cDNA-templátok minőségéről és a PCR-inhibitorok jelenlétéről.

A vizsgálat fragmentumanalízissel végzendő, kapilláris gélelektroforézis alkalmazásával. Transzkripciónként egy primer fluoreszcens jelöléssel van ellátva (6-FAM, BTG vagy BTY,) a Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE, GmbH). kiegészítő színspektrumával.

Táblázat 1 A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit készülékkel kimutatható génfúziók és transzkripciósi variánsok

Génfúzió	Kromoszóma-rendellenesség	Variáns	Szisztematikus variánsleírás
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
PICALM::MLLT10	t(10;11) (p12.3;q14.2)	b2a3	BCR:e13::ABL1:e3
		MLLT10_240-PICALM_1987	MLLT10:e3::PICALM:e19
CBFB::MYH11	inv(16) (p13.1;q22)	MLLT10_240-PICALM_2092	MLLT10:e3::PICALM:e20
		Type A	CBFB:e5::MYH11:e33
		Type B	CBFB:e5::MYH11:e32
		Type C	CBFB:e5::MYH11:e31
		Type D	CBFB:e5::MYH11:e29
		Type E	CBFB:e5::MYH11:e28

Génfúzió	Kromoszóma- rendellenesség	Variáns	Szisztematikus variánsleírás
		Type F Type G Type H Type I Type J	CBFB:e4::MYH11:e33 CBFB:e4::MYH11:e29 CBFB:e4::MYH11:e28 CBFB:e4::MYH11:e34 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; 6A_L) 7A 8A 6B	KMT2A:e8::MLLT3:e6 KMT2A:e8::MLLT3:e7 KMT2A:e8::MLLT3:e8 KMT2A:e8::MLLT3:e6
KMT2A::ELL	t(11;19) (q23.3;p13.1)	e10e2 e10e3	KMT2A:e8::ELL:e2 KMT2A:e8::ELL:e3
KMT2A-PTD	Partial Tandem Duplication	e9e3 e10e3 e11e3	KMT2A:e8::KMT2A:e2 KMT2A:e9::KMT2A:e2 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 bcr2 bcr3	PML:e6::RARA:e3 PML:e5::RARA:e3 PML:e3::RARA:e3

A vizsgálatot kb. 300 AML-ben szenvedő beteg génfúziós szűrésével validáltuk, és egy összehasonlító klinikai értékelő vizsgálatban igazoltuk a megfelelését.

A kvalitatív értékelés kimutatási határértéke 400 RFU. Minden génfúzió esetében átlagosan legalább 1000 másolatot lehet kimutatni.

A reverz transzkripció reakció standard körülmények közötti általános bemeneti tartománya 100 ng – 1 µg teljes RNA, teljes vérből vagy csontvelőből izolálva.

A reverz transzkripció optimális outputja a csontvelő esetében 500 ng RNA, a perifériás vér esetében pedig 1 µg RNA. A PCR vizsgálat 1 µL cDNA-t használ.

A készletben megtalálható anyagok

Táblázat 2 Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit – tartalom

Reagens	Kupak színe		Térfogat csomagolási méretenként		
			25 reakció	100 reakció	400 reakció
Nuclease-Free Water	Világoskék		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	Piros		63 µL	250 µL	4 x 250 mL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Fehér		10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Positive Control	Fehér		25 µL	25 µL	25 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Narancssárga		13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Allelic Ladder	Zöld		25 µL	25 µL	4 x 25 µL

A komponens-tételszámok áttekintése a dobozlap belső oldalán található címkén található.

MEGJEGYZÉS

i

Felhívjuk a figyelmét, hogy a csomagolás mérete a vizsgálatok számát **anélkül** írja le, hogy figyelembe venné a szükséges kontrollok számát vagy a pipettázáshoz szükséges többletet.

A következő méret használatát javasoljuk a megfelelő átviteli kapacitáshoz:

- < 8 minta PCR-futtatásonként: 25 reakció csomagolási mérete
- 8–45 minta PCR-futtatásonként: 100 reakció csomagolási mérete
- > 45 minta PCR-futtatásonként: 400 reakció csomagolási mérete

A komponensek ismertetése

Nuclease-Free Water: PCR minőségű víz a PCR-beállításhoz használva, és nem templatmentes kontrollként (NTC).

Reaction Mix A: PCR-puffer, tartalma: dNTPs és MgCl₂. A PCR-puffer optimalizálva van, hogy elősegítse a PCR enzimaktivitását.

Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix: címkézett primert tartalmazó multiplex oligonukleotid primerkeverék (címke: 6-FAM[™], BTG, BTY) és címkézetlen primerek.

Multi Taq 2 DNA Polymerase: Hot start Taq DNA polymerase, 2,5 U/μL.

Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control: öt DNA-fragmentum duplán sodort mesterséges DNA-keveréke. Kvalitatív, külső PCR-kontrollként használható, amely mindhárom panelen pozitív a következő célpontok tekintetében: BCR::ABL_b2a3, RUNX1::RUNX1T1, ABL-control, KMT2A-PTD_e11e3 és PML::RARA_bcr3, továbbá a QS a mintaérvényesség minőségi markereként amplifikálódik.

MEGJEGYZÉS



A Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control nem kritikus a laboratóriumi szakember számára, mivel tisztított, nem veszélyes és aktív biológiai funkciókkal nem rendelkező egyedi DNA-molekulákból áll. Nem tartalmaz olyan élő sejteket vagy patogén organizmusokat, amelyek közvetlen veszélyt jelenthetnének.

DNA Size Standard 550 (BTO): fluoroforos jelöléssel ellátott PCR-fragmentumok keveréke – a meghatározott fragmenshossz 60 és 550 bp közé esik, a komponenst minden PCR-termékhez hozzá kell adni a fragmentumhossz-analízis előtt; méretregresszióhoz használható a PCR-termékek fragmentumhosszána pontos meghatározása céljából.

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder: fluoroforos jelöléssel ellátott PCR-fragmentumok keveréke, amely a Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit összes kimutatható allélját képviseli. 22 6-FAM[™], jelölésű fragmentumot, 12 BTG jelölésű fragmentumot és 2 BTY jelölésű fragmentumot tartalmaz,

amelyek genotípus-referenciaként használhatók a pontos allélazonosításhoz.

Reagensek tárolása és kezelése

A készlet szárazjégen kerül kiszállításra. A készlet komponenseinek fagyasztott állapotban kell megérkezniük, a Multi Taq 2 DNA Polymerase kivételével, amely a reagens fagyását megakadályozó pufferben tárolandó.

Kérjük, hogy átvételkor ellenőrizze a készlet hiánytalanságát. Ne használjon olyan készleteket, amelyek megérkezésükkor fel voltak olvasztva. Ha egy vagy több komponens nincs lefagyasztva, illetve ha a mintavételi csövek vagy a csomagolás megsérült a szállítás során, a teljesítmény nem garantálható.

Minden komponenst $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ között, fénytől védve kell tárolni. Különösen a Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix, DNA Size Standard 550 (BTO) és a Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder esetében előírás a fénytől védett tárolás.

A szennyeződés elkerülése érdekében az előamplifikáló komponensek (RNA- és cDNA-minták), a Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control) és az utóamplifikáló komponensek (DNA Size Standard 550 (BTO) és Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder) PCR-reagensektől (Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A és Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix) való elkülönített tárolását és felhasználását javasoljuk.

A készlet eltarthatósági ideje a készlet dobozának címkéjén feltüntetett időpont, illetve a felbontás után 24 hónap, attól függően, hogy melyik következik be előbb. Ne lépje túl a legfeljebb 20 fagyasztási-olvasztási ciklust.

Szükséges, de a készletben nem megtalálható anyagok és eszközök

Általános laboratóriumi berendezések

- Asztali centrifuga rotorral 2 mL-es és 200 µL-es reakciócsövekhez
- Centrifuga rotorral mikrotiterlemezekhez 96 vájulatos reakciólemezekhez

- Kémcsőkeverő (vortex)
- Kalibrált, állítható pipetták eldobható aeroszolzáró szűrőhegyekkel
- Megfelelő 200 µL-es 96 vájulatatos reakciólemezek vagy 200 µL-es reakciócsövek a megfelelő záróanyaggal, PCR-minőségben
- Megfelelő állványok 2 mL-es és 200 µL-es reakciócsövekhez
- 2 mL-es csövek tárolására alkalmas hűtőállvány
- Eldobható púdermentes kesztyű
- NanoDrop™ One Spectrophotometer vagy Qubit™ Fluorometer

MEGJEGYZÉS

i

A PCR-hez használt összes anyagnak megfelelő minőségűnek kell lennie (DNA-mentes, és alkalmazható molekuláris biológiai célra). Kérjük, győződjön meg arról, hogy minden használt műszert a gyártó utasításai és ajánlásai szerint telepítettek, kalibráltak, ellenőriztek és tartottak karban.

Reagensek, készletek és fogyóeszközök

Felhívjuk a figyelmét, hogy egyes reagensek és fogyóeszközök meghatározott kombinációkban használandók, és nincs szükség mindegyikre minden futtatáshoz.

Táblázat 3 Szükséges, de a készletben nem megtalálható anyagok és eszközök

Reagens	Beszállító	Megrendelési szám
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 preparations)	Macherey-Nagel	740201.50
Maxwell® CSC RNA Blood Kit (48 preparations)	Promega	AS1410

Reagens	Beszállító	Megrendelési szám
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 samples)	Thermo Fisher Scientific	4393715
POP-7™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 samples)	Thermo Fisher Scientific	4393708
Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series	Thermo Fisher Scientific	4393927
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

Műszerek és szoftverek

A Minta-előkészítés című fejezetben ismertetett manuális, oszlopalapú kivonási módszerek mellett a következő automatizálás használható RNA-kivonáshoz:

- Maxwell® CSC készülék (kat. szám: AS6000, Promega)

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit készletet a következő PCR-készülékekkel való használatra validáltuk:

- ProFlex PCR System (kat. szám: 4484073 (3 x 32 vájulatatos mintablokk), 4484075 (96 vájulatatos mintablokk); Thermo Fisher Scientific
- GeneAmp® PCR System 9700 Silver (megszakítva, Thermo Fisher Scientific)
- Mastercycler nexus gradient (kat. szám: 6331000017, Eppendorf AG)
- Mastercycler ep-S (megszakítva, Eppendorf AG)

- Biometra Tadvanced (kat. szám: 846-2-070-211; Analytik Jena)

Az előbb felsoroltaktól eltérő PCR-készülékek alkalmazását a felhasználónak validálnia kell. Az alábbi előírásokat kell követni:

- Fűtött fedél
- 200 µL-es reakciólemezekhez/-csövekhez való blokk
- 4 °C/s-ig állítható felfutás

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit készletet a következő műszerekkel és beállításokkal való használatra validáltuk:

- Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), szoftververzió: 4.0.1
 - POP-4™ Polymer a 3500/3500xL Genetic Analyzer analízátorhoz
 - POP-7™ Polymer a 3500/3500xL Genetic Analyzer analízátorhoz
 - 3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 36 cm
 - 3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 50 cm
- SeqStudio™ Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), szoftververzió: 1.2.4

Az adatelemzés a

- GeneMapper™ ID-X software szoftverrel történt (1.6-os verzió (Thermo Fisher Scientific), termékspecifikusan használva:
 - Analysis Method: AMLplexIVD_Analysis1_v1x vagy AMLplexIVD_Analysis4_v1x vagy AMLplexIVD_Analysis7_v1x
 - Bin: AMLplexIVD_Bins1_v1x vagy AMLplexIVD_Bins4_v1x vagy AMLplexIVD_Bins7_v1x
 - Panel: AMLplexIVD_Panel1_v1x vagy AMLplexIVD_Panel4_v1x vagy AMLplexIVD_Panel7_v1x
 - Size Standard: BTO_60-550_v1x

Az fsa-fájlok vagy az adatgyűjtő szoftverrel megadott bármely eredmény kézi értékelése az adatelemzésre és értékelésre szolgáló szoftver nélkül nem tekinthető validáltnak.

MEGJEGYZÉS



Kérjük, győződjön meg arról, hogy minden használt műszert a gyártó utasításai és ajánlásai szerint telepítettek, kalibráltak, ellenőriztek és tartottak karban.

Minták és vizsgálati minták

Az alábbi mintákat validáltuk a Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit készülékkel:

- Humán perifériás vénás vérminták (EDTA, citrát, heparin és RNA Exact stabilizátor), 4 °C-on tárolva és 24 órán belül RNA-tisztítás céljából feldolgozva.
- Csontvelőminták (EDTA, heparin), 4 °C-on tárolva és 24 órán belül RNA-tisztítás céljából feldolgozva.

A kapott RNA-t hígítatlan állapotban, –85 °C és –70 °C közötti hőmérsékleten kell tárolni.

MEGJEGYZÉS



Kérjük, győződjön meg arról, hogy a vérmintavételhez használt véralvadásgátló szer megfelel az RNA-izoláló készlet gyártói utasításának.

Figyelmeztetések és óvintézkedések

- A termék használata előtt figyelmesen olvassa el a használati utasítást.
- Olvassa el az összes BIOTYPE termék biztonsági adatlapját (SDS) és a nem veszélyességre vonatkozó mondatokat (NHS), amelyek kérésre vagy az alábbi elérhetőségen állnak rendelkezésre: www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter. Azon termékek esetében, amelyekhez nem szükséges SDS, mivel nem tartalmaznak SVHC-t, azaz különös aggodalomra okot adó anyagot, vagy az 1272/2008 (CLP) rendelet egyéb korlátozásai vonatkoznak rájuk, a BIOTYPE kérésre rendelkezésre bocsátja az SDS-t.

- Kérjük, forduljon a szükséges, de a készletben nem megtalálható anyagok és reagensek gyártóihoz a további szükséges reagensek SDS-ének másolatáért.
- A különböző készlettételek készletkomponenseit nem szabad egymással keverni.
- A készlet komponenseinek más reakcióedényekbe történő kimérése nem megengedett.
- A termék használata kizárólag a molekuláris-genetikai technikák, a multiplex PCR és a Thermo Fisher Scientific. Genetic Analyzers analizátorainak kezelésére kiképzett laboratóriumi szakemberek számára engedélyezett.
- Az első használat előtt ellenőrizze a terméket és annak komponenseit a következőket illetően:
 - Épség
 - Hiánytalanság a darabszám, a típus és a töltet tekintetében (lásd az A készletben megtalálható anyagok c. fejezetet)
 - Helyes címkézés
 - Fagyasztott állapot érkezéskor (kivéve: Multi Taq 2 DNA Polymerase)
- A mintákat mindig fertőző és/vagy biológiai veszélyt jelentő mintaként kell kezelni a biztonságos laboratóriumi eljárásokkal összhangban.
- Ne használjon olyan készletet, amelynek lejárt a szavatossági ideje.
- A mintát és a vizsgálati hulladékot a helyi biztonsági és ártalmatlanítási előírásoknak megfelelően kell megsemmisíteni.
- Minden használt műszert a gyártó utasításainak és ajánlásainak megfelelően kell telepíteni, kalibrálni, ellenőrizni és karbantartani.

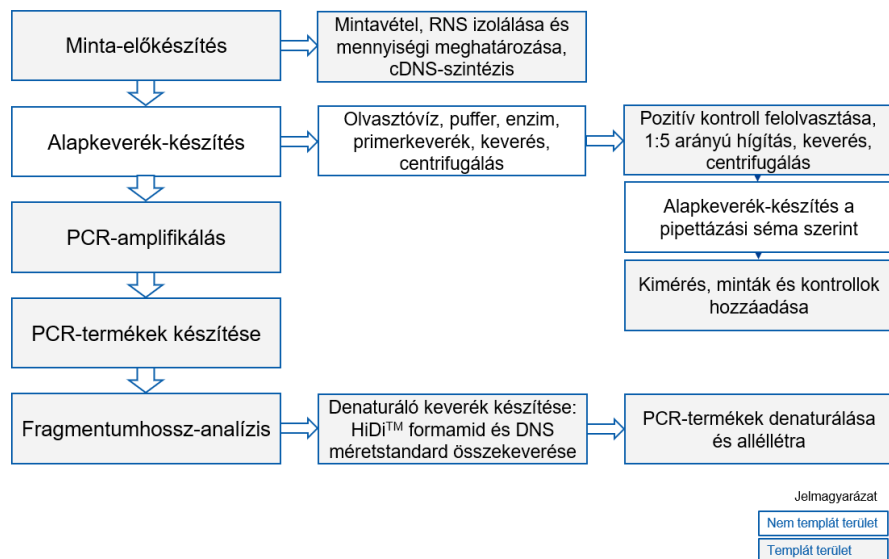
Értesítés a felhasználó számára

A termékkel kapcsolatban felmerülő bármilyen problémát a felhasználó köteles jelenteni a gyártónak. A készlettel kapcsolatos minden súlyos nemkívánatos eseményt jelenteni kell a gyártónak és az illetékes hatóságnak a felhasználó és/vagy a beteg székhelye szerinti tagállamban. A biztonságosságra és a teljesítőképességre vonatkozó összefoglaló (SSP) az (EU) 2017/746 rendelet 29. cikkével összhangban lett létrehozva, és célja, hogy az EUDAMED adatbázison keresztül nyilvános hozzáférést biztosítson a készülék biztonságosságára és a teljesítőképességére

vonatkozó adatok frissített összefoglalójához a célfelhasználók számára, kizárólag a termékkel dolgozó laboratóriumi szakemberek esetében.

Eljárás

A kísérleti munkafolyamat áttekintése



Minta-előkészítés

A nyers mintákkal szemben támasztott követelmények

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit készlethez szükséges minta definíció szerint a perifériás vénás teljes vérből vagy az emberből nyert csontvelőből kivont RNA-ból átirított cDNA.

A mintavételezés során RNA-stabilizálásra szolgáló reagensok használatát javasoljuk. Az RNA-stabilizátorok segítenek az RNA integritásának megőrzésében (pl. S-Monovette RNA Exact). Az RNA-izolálást a mintavétel után azonnal el kell végezni.

MEGJEGYZÉS



A nyers mintaanyag hosszú tárolása a genetikai anyag fragmentációját és ezáltal az anyag elégtelen minőségét idézheti elő. Ez csökkent intenzitású jelek vagy érvénytelen belső kontrollok révén ronthatja az analízis eredményét.

Vér

Vegyen legalább 200 µL mintát a perifériás vénás teljes vérből a következő eljáráshoz.

A perifériás vénás teljes vér kezelése során a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ajánlását kell követni (guideline MM05–A2 (2nd edition), amely kimondja, hogy a teljes vér legfeljebb 24 órán keresztül tárolható szobahőmérsékleten (22 °C és 25 °C között) vagy legalább 72 órán keresztül 2 °C és 6 °C között. Továbbá ajánlott, hogy a teljes vér gyűjtéséhez használt véralvadásgátló EDTA, citrát vagy heparin legyen.

Csontvelő

Vegyen legalább 200 µL csontvelőmintát a következő eljáráshoz.

A csontvelőből felszívott minták kezelésének a CLSI guideline MM05–A2 (2nd edition) ajánlását kell követnie, amely szerint az antikoagulált (EDTA vagy citrát) csontvelőből felszívott mintákat 4 °C -on kell tárolni és szállítani. Az RNA-t a legjobb eredmények eléréséhez a mintavétel után 1–4 órán belül ki kell vonni.

RNA-kivonás

Az RNA-kivonást és tisztítást a perifériás teljes vérből (PB) vagy a csontvelőből (BM) felszívott mintákból a következő készletek valamelyikével kell végezni:

- RNeasy® Midi/ Mini/ Plus Mini Kit (Qiagen GmbH): EDTA, citrát és heparin véralvadásgátló BM-en és PB-n
- NucleoSpin® Dx RNA Blood (Macherey-Nagel): RNA Exact stabilizátor PB-n

- Maxwell® CSC RNA Blood Kit (Promega): EDTA és heparin véralvadásgátló BM-en

Kérjük, kövesse az RNA-kivonásra vonatkozó gyártói kézikönyveket és ajánlásokat. Az izolálás során ajánlott **DNase-roncsolást** végezni a gyártó utasításai szerint.

MEGJEGYZÉS



A vérszennyezés vizuálisan kimutatható a PCR-reakcióban, vagy az izolált RNA-ben narancssárga színváltozás jelzi. Színváltozás észlelése esetén javasoljuk, hogy ismételje meg a RNA-izolálást, hogy elkerülje a lehetséges interferenciát.

MEGJEGYZÉS



A nukleinsav elúciója előtt távolítsa el az etanol nyomait. Az etanol a PCR erős inhibitora.

Az RNA mennyiségi meghatározása és hígítása

Az RNA-koncentráció UV/VIS spektroszkópiával, 260 nm-en mérve, NanoDrop™ One spectrophotometer segítségével, vagy fluoreszcencia-spektroszkópiával, a Qubit™ Fluorometer használatával határozható meg.

Spektrofotometria alkalmazása esetén a RNA-kivonásra szolgáló készletből származó elúciós pufferrel mérje meg a vakmintát. Az A260/A280 aránynak a az 1,9–2,1, míg az A260/A230 aránynak az 1,8–2,3 tartományban kell lennie.

Az RNA fluorometriás mennyiségi meghatározása esetén a Qubit™ Fluorometer a Qubit™ RNA HS Assay-Kit vagy a Qubit™ RNA BR Assay-Kit egyikével használható.

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit készlettel való használathoz hígítsa fel az RNA-mintákat a későbbi cDNA-be történő átíráshoz megfelelő koncentrációra. Felhasználás előtt készítsen friss hígítást. Hígítószerként nukleázmentes vizet használjon.

MEGJEGYZÉS



A cDNA-ba való átírás bemeneti tartománya a transzkripció készlet gyártójának utasításait követi. A 100 ng – 1 µg RNA 20 µL végső reakciótérfogatban való használata a cDNA-szintézishez mindkét mintatípus esetében validáltnak tekinthető. A **csontvelő** esetében **500 ng**, a **perifériás vér** esetében **1 µg** optimális adag alkalmazását javasoljuk.

Az RNA tárolása

A hígítatlan RNA-mintákat RNase mentes vízben, –25 °C és –15 °C között legfeljebb 24 órán át tárolja, –85 °C és –70 °C között akár egy évig is tárolhatók.

Átírás cDNA-be

Az RNA-kivonást és tisztítást a perifériás teljesvér-mintákból a gyártói előírásoknak megfelelően a következő készletek valamelyikével kell végezni:

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

*kis RNA-mennyiségnél javasolt

MEGJEGYZÉS



A reverz transzkriptáz **termikus inaktiválása** döntő fontosságú a PCR teljesítménye szempontjából. A részletekért lásd a gyártó utasításait.

A cDNA tárolása

A cDNA-minták –25 °C – –15 °C-on legfeljebb egy évig tárolhatók.

A kontroll előkészítése

Pozitív kontroll (PC)

Olvassa fel a Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control pozitív kontrollt, és óvatos vortexeléssel homogenizálja, majd rövid ideig centrifugálja.

Hígítsa fel a Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control pozitív kontrollt 1:5 arányban a készlet részét képező Nuclease-Free Water használatával. Például keverjen össze 1 µL kontrollt és 4 µL Nuclease-Free Water-t.

Homogenizálja a hígított PC-t óvatos vortexeléssel. Ezután rövid ideig centrifugálja a hígított PC-t (kb. 5 másodpercig).

Ne tárolja a hígított pozitív kontrollt.

MEGJEGYZÉS



Mindig a Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control friss hígítását alkalmazza.

Templátmentes kontroll (NTC)

A készletben található nukleázmentes vizet NTC templátmentes kontrollként alkalmazza minta helyett.

Az alapkeverék beállítása

Vegye ki az alábbi komponenseket a Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit készletből, és olvassa fel őket:

- Nuclease-Free Water (világoskék kupak)
- Reaction Mix A (lila kupak)
- Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix (piros kupak)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (fehér kupak)

Az összes lefagyasztott komponenst szobahőmérsékleten (22 °C és 25 °C között, körülbelül 30 percig, fénytől védve) fel kell olvasztani, és a csövek forgatásával, pipetázással vagy óvatos vortexeléssel homogenizálni kell. Ezután rövid ideig centrifugálja a reagenseket (kb. 5 másodpercig). Az

alapkeverék beállítása előtt a Multi Taq 2 DNA Polymerase-t ajánlott minél tovább hűtött környezetben tartani (pl. hűtőállványon).

MEGJEGYZÉS



A tartós stabilitás érdekében a Multi Taq 2 DNA Polymerase-t pöckölgetve keverje – **ne vortexelje az enzimet.**

Készítse elő a PCR alapkeveréket a Táblázat 4 alapján a vizsgálandó minták teljes számának megfelelő méretű mikrocentrifuga-csőben egy, az adott célra kialakított tiszta felületen. Vonjon be legalább egy PC-t és egy NTC-t a számításba.

MEGJEGYZÉS



Ökölszabály: ha 10-nél kevesebb mintát vizsgál, használjon annyi alapkeveréket, amennyi egy további mintához is elegendő. Ha 10 vagy több mintát vizsgál, a reagens alapkeveréket 10%-os feleslegben használja.

Táblázat 4 A PCR alapkeverék reakcióbeállítása

Komponens	Térfogat		
	# 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 templát vagy kontrollminta*	1,0 µL	5 x 1,0 µL	10 x 1,0 µL
Össztérfogat	25,0 µL	125,0 µL	250,0 µL

*A templátbevitel 2 µL-re növelhető, ehhez a nukleázmentes víz mennyiségét be kell állítani.

Kevertesse az alapkeveréket óvatos vortexeléssel, majd rövid ideig centrifugálja.

Mérjen ki 24,0 µL PCR alapkeveréket az előkészített 200 µL-es PCR-csővekbe, és rövid ideig centrifugálja a lezárt csöveket.

cDNA-templátok és kontrollok alkalmazása

Adagoljon 1,0 µL-t a következő mintatípusokból a PCR-alapkeveréket tartalmazó, előkészített PCR-csővekbe.

NTC: adagoljon 1,0 µL Nuclease-Free Water-t minta helyett.

cDNA templát: adagoljon 1,0 µL-t a hígítatlan cDNA-mintákból.

PC: adagoljon 1,0 µL frissen készített, **1:5** hígítású Mentype® AMLplex^{QS} Positive Contro-t minta helyett.

MEGJEGYZÉS



Először az NTC-t készítse elő a kontroll szennyeződéseinek elkerülése érdekében. A PC-t utoljára készítse el, megelőzve ezzel a minták keresztszennyeződését.

MEGJEGYZÉS



Futtatásonként legalább egy pozitív PC-kontrollt és egy templátmentes NTC-kontrollt kell használni. Máskülönben a futtatás nem validálható.

Zárjon le minden PCR-csövet, óvatosan vortexelje, és centrifugálja le.

PCR-amplifikálás

Programozza be a PCR-készüléket a következő amplifikálási profillal, és állítsa be a felfutást 4 °C/s értékre. Hajtson végre „melegindítású” PCR-t a polimeráz aktiválása és a nem specifikus amplifikálási termékek képződésének megakadályozása érdekében.

MEGJEGYZÉS



A kalibrált és megfelelően karbantartott PCR-készülékek használata alapvető fontosságú, mivel az eltérések kedvezőtlenül befolyásolhatják az érzékeny célpontok amplifikálását, például KMT2A::MLLT4.

Táblázat 5 PCR-protokoll

Hőmérséklet	Idő	
96 °C	4 min	(melegindítás a polimeráz aktiválásához)
96 °C	30 s	
60 °C	120 s	25 ciklus
72 °C	75 s	
68 °C	10 min*	
10 °C	∞	tartás

* Nagyobb mennyiségű negatív adenincsúcs (–1 bázispár) észlelése esetén 60 percre kiterjeszhető.

MEGJEGYZÉS



Állítható fűtési és hűtési sebesség funkcióval rendelkező termikus készülékek használata esetén az optimális készletegyensúly biztosítása érdekében **a felfutást 4 °C/s-ra kell beállítani.**

MEGJEGYZÉS



A különböző PCR-műszerek beállításával, programozásával és karbantartásával kapcsolatos alapvető információkért, kérjük, olvassa el az adott műszer felhasználói kézikönyvét.

Kapilláris gélelektroforézis

A PCR-termékek előkészítése

A PCR végrehajtása után távolítsa el a mintákat a készülékből, és rövid ideig centrifugálja őket.

MEGJEGYZÉS



A PCR végrehajtása után a PCR-termékek 4 hétig 2 °C és 8 °C között, illetve tartósan –25 °C és –15 °C között tárolhatók, fénytől védve.

Olvassa fel, kevertesse és centrifugálja a reagenseket:

- Hi-Di™ Formamide (nincs a készletben)
- Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder (zöld kupak)
- DNA Size Standard BTO (550) (narancssárga kupak)

Készítse elő a denaturáló keveréket a Táblázat 6 leírt módon, vagy adjon hozzá egy vagy két reakciót a pipettázási eltérések kompenzálása céljából. Adjon meg egy további reakciót az allélétrához.

Táblázat 6 Denaturáló keverék

Komponens	Reakciónkénti térfogat
Hi-Di™ Formamide	12,0 µL
DNA Size Standard BTO (550)	0,5 µL

Pipetázzon 12,0 µL denaturáló keveréket egy PCR-lemez vájolataiba (a Genetic Analyzer-rel való használatra alkalmas).

Tegyen 1,0 µL PCR-terméket vagy 1,0 µL Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder allélétrát a vájulatokba. Zárja le a PCR-lemezt megfelelő fóliával, vortexelje, és rövid ideig centrifugálja a lemezt.

MEGJEGYZÉS



Az alléllétra az adatelemzés során elemzett fragmentumok helyes meghatározására használható. Az alléllétrát minden fragmentumhossz-elemzési futtatás során legalább egyszer analizálni kell a sikeres adatelemzés érdekében.

MEGJEGYZÉS



A gélelektroforézishez használt készülék kapillárisai soha nem alkalmazhatók szárazon. Ha a minták nem foglalják el az összes kapillárispozíciót, töltsse fel a lemez további vajúzatait 12,0 µL Hi-Di™ Formamide anyaggal a kapillárisok számának megfelelően.

Denaturálja az előkészített PCR-termékeket a PCR-készüléken 3 percig 95 °C-on, majd hűtse le a mintákat 4 °C-ra a készülékben. A fragmentumhossz-analízis megkezdése előtt a mintákat rövid ideig centrifugálni kell.

Fragmentumhossz-analízis

Az első fragmentumhossz-analízis előtt futtassa le a **Matrix Standard BT5 multi-t** (BIOTYPE GmbH) a Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit készlethez (6-FAM™, BTG, BTY, BTO) használt fluoreszcens festékek spektrális összehangolására.

MEGJEGYZÉS



Olvassa el a Matrix Standard BT5 multi használati utasítását a telepítéshez. Elérhető a www.biotype.de/en/ifus weboldalon, illetve kérésre a BIOTYPE GmbH. support@biotype.de oldalán keresztül.

A Matrix Standard BT5 multi sikeres futtatása után importálja a 3500 Genetic Analyzer rendelkezésre álló műszerbeállításait a [Táblázat 7](http://www.biotype.de/en/template-files) leírt módon (www.biotype.de/en/template-files).

Táblázat 7 A Genetic Analyzers analizátorhoz rendelkezésre álló fájlok
(www.biotype.de/en/template-files)

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

A szükséges műszerprotokollhoz tartozó leírásokat a [Táblázat 8](#) ismerteti. Csak a leírt paramétereket kell beállítani, a többi paraméter maradjon az alapértelmezett beállításban. A speciális futási paraméterek beállításához kövesse a gyártó használati utasítását.

Táblázat 8 A kapilláris gélelektroforézishez használt különböző eszközök futási moduljainak paraméterei

	Injections 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

A Táblázat 8 megadott értékektől eltérően a futási időt úgy be lehet állítani, hogy a DNA Size Standard 550 (BTO) összes fragmentumát (60–550 bp) elemezni lehessen.

A Size Standard protocol beállításához a DNA Size Standard 550 (BTO) következő méreteit kell hozzárendelni a narancssárga panelhez:

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 és 550 bp.

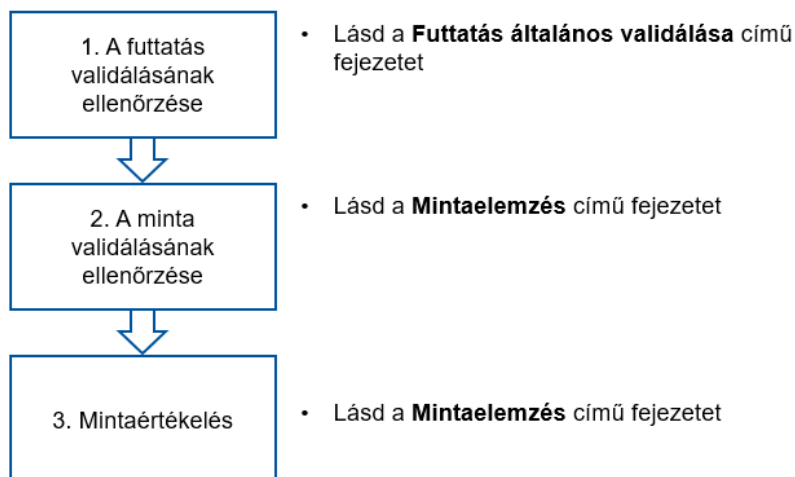
MEGJEGYZÉS



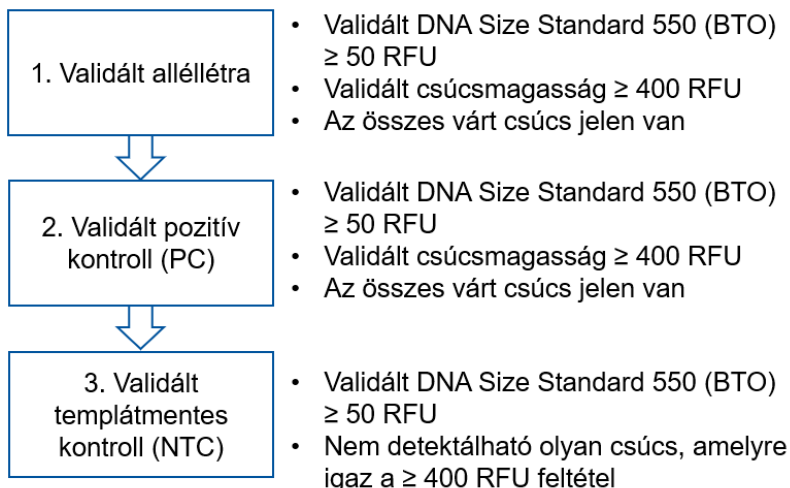
A BIOTYPE GmbH speciális templatokat biztosít a fragmentumhossz-analízishez szükséges speciális futtatási beállítások egyszerű telepítéséhez, valamint elemzési templatokat a GeneMapper™ ID-X. egyszerű szoftverbeállításához. GeneMapper™ ID-X. Ezek a templatok a következő helyről tölthetők le: www.biotype.de/en/template-files.

Adatelemzés

Általános adatelemzési eljárás



Futtatás általános validálása



MEGJEGYZÉS



A 50 bp és 560 bp közötti teljes mérési tartományt elemezni kell az érvényesség értékeléséhez.

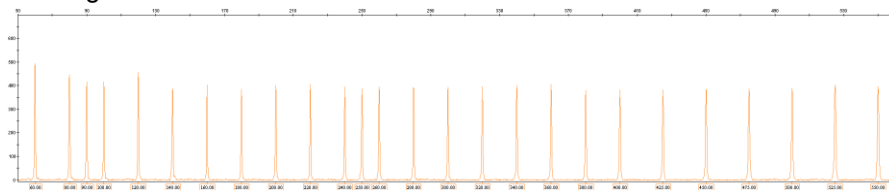
DNA Size Standard 550 (BTO)

Az amplifikált termékek pontos hosszának meghatározása függ a készülék típusától, az elektroforézis körülményeitől, valamint a használt DNA méretstandardtól. Egyes célpontok összetettsége miatt a méretmeghatározásnak egyenletesen elosztott referenciákon kell alapulnia.

Minden mintánál ellenőrizze a DNA Size Standard 550 (BTO) standardot az alábbi kritériumok tekintetében:

- Az összes fragmentum megléte az alábbi számú bázispároknál: **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 és 550 bp** (lásd: 1)
- Az összes fragmentumra teljesül a ≥ 50 RFU kritérium
- R² meghatározási együttható $> 0,995$**
(lásd: Size Match Editor , GeneMapper™ ID-X)

- A fragmentumok csúcsmagassága nem csökken folyamatosan a fragmentumhossz növekedésével.



1 A DNA Size Standard 550 (BTO), elektroferogramja, fragmentumok és hosszak a bázispárokbán

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder

Az érvényes méretstandard biztosítása után ellenőrizze, hogy az allélétrán minden csúcs esetében teljesül-e a **≥ 400 RFU** kritérium.

MEGJEGYZÉS



A Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder minden detektálható célponthoz egy csúcsot szolgáltat. Hasonlítsa össze az alléleket a függelék 2.

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

Az érvényes méretstandard biztosítása után ellenőrizze, hogy a PC összes specifikus csúcsa esetében teljesül-e a **≥ 400 RFU** kritérium.

A tesztkészlet részét képező Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control az alábbi célpontokat képviseli (lásd: Táblázat 9)

Táblázat 9 Kontrollcsúcsok a Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control pozitív kontrollban

Panel	Kontrollcsúcs
Kék	▪ QS-Control ▪ BCR::ABL_b2a3 ▪ RUNX1::RUNX1T1 ▪ ABL-Control

Panel	Kontrollcsúcs
Zöld	▪ KMT2A-PTD_e11e3
Sárga	▪ PML::RARA_bcr3

MEGJEGYZÉS

A Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control minden használt panelhez legalább egy csúcsot szolgáltat. Hasonlítsa össze az alléleket a függelék 3.

No template control NTC

Az érvényes méretstandard biztosítása után ellenőrizze, hogy nem észlelhető-e a **≥ 400 RFU** kritériumnak megfelelő csúcs az NTC-ben (lásd még a függelék 4 is).

MEGJEGYZÉS

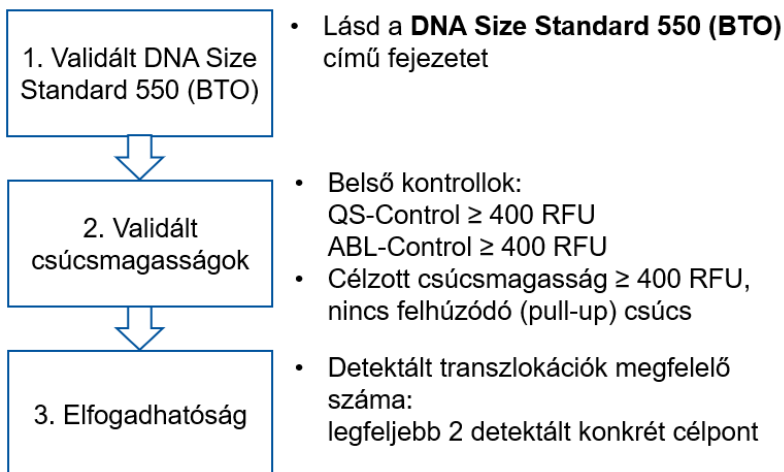
A GeneMapper™ ID-X és az analízismódszer biztosított templátfájljainak együttes használatával a Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit minták 400 RFU alatti csúcsaihoz a rendszer automatikusan nem rendeli hozzá az allélnevet, így a felhasználó könnyen kiértékelheti az NTC-t.

MEGJEGYZÉS

Az olyan artefaktumok, mint a kis festékfoltok, jellemzőbben előfordulhatnak az NTC-ben. A széles csúcsalap, a rendellenes csúcsalak és a csúcskijelölés hiánya miatt lehetőség adódik az amplikoncsúcsoktól való megkülönböztetésre.

Mintaelemzés

Munkafolyamat-adatelemzés



MEGJEGYZÉS



Ha több célpont észlelése meghaladja a küszöbértéket, vagy ha bármilyen bizonytalansággal szembesül, kérjük, ellenőrizze a hibaelhárítási szakaszt (pl. a ismert jelkombinációk listáját), vagy vegye fel a kapcsolatot az ügyfélszolgálattal a support@biotype.de címen.

A GeneMapper™ ID-X software és a BIOTYPE GmbH által biztosított specifikus templátok együttes használata esetén az alapvető validálás automatikus folyamat.

A futtatás és a mintaérvényesség ellenőrzése után a minta adatait ki kell értékelni.

MEGJEGYZÉS



A Mentype® AMLplex^{QS} **kizárólag kvalitatív vizsgálat**. Ez az alkalmazás nem alkalmas másolatszámok számszerűsítésére, illetve a minimális reziduális betegség (MRD) monitorozására.

A BIOTYPE GmbH értékelési templátok használata és a futtatás alléltrájának sikeres értékelése esetén az észlelt PCR-fragmentumok elnevezése automatikus folyamat. A következő Táblázat 10 áttekintést nyújt a PCR-termékek fragmentumainak hosszáról.

Táblázat 10 A Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder transzlokációi fragmentumhosszainak áttekintése a POP-4TM polimeren. ‡ Két ampikon a KMT2A variánshoz: MLLT3_6A; * Noha ez a variáns kimutatható a Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit, segítségével, az ampikon változó hossza (kb. 173 bázispár) megakadályozza az automatizált allokációt

Panel/ Transzlokáció	Hossz [bp]	Panel/transzlokáció	Hossz [bp]
FAM Panel (kék csatorna)		BTG Panel (zöld csatorna)	
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

Panel/ Transzlokáció	Hossz [bp]	Panel/transzlokáció	Hossz [bp]
MLLT10_240::PICALM_2092	265	KMT2A::MLLT3_6A_L†	497
CBFB::MYH11_TypeA	271	BTY Panel (sárga csatorna)	
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		
MLLT10_240::PICALM_1987	371		
BCR::ABL_e1a2	380		
NPM1::MLF1	389		
CBFB::MYH11_TypeB	485		
ABL-Control	519		

Adatelemzés GeneMapper™ ID-X segítségével

A GeneMapper™ ID-X software előkészítése

A szoftverrel kapcsolatos alkalmazásra és a mintaelemzésre vonatkozó általános utasítások a GeneMapper™ ID-X Software felhasználói kézikönyvében találhatók.

Az allél-hozzárendelést a GeneMapper™ ID-X elemző szoftverrel kell végezni a BIOTYPE GmbH Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit templátfájljaival. A BIOTYPE templátfájlok (lásd: Táblázat 11) honlapunkról (www.biotype.de/en/template-files) letölthetők vagy a support@biotype.de címen igényelhetők. A GeneMapper™ ID-X software szoftvert használó elemzési munkafolyamatot a Táblázat 12 szemlélteti.

Táblázat 11 BIOTYPE GmbH templatok, GeneMapper™ ID-X Software, sablonok specifikusan a ¹POP-1™, ²POP-4™ and ³POP-7™ polymer

Templát	Templát neve	
Panels*	AMLplexIVD_Panel1_v1x ¹ AMLplexIVD_Panel4_v1x ² AMLplexIVD_Panel7_v1x ³	vagy magasabb verziók
BinSets*	AMLplexIVD_Bins1_v1x ¹ AMLplexIVD_Bins4_v1x ² AMLplexIVD_Bins7_v1x ³	vagy magasabb verziók
Size Standard*	BTO_60-550_v1x	vagy magasabb verziók
Analysis Method*	AMLplexIVD_Analysis1_v1x ¹ AMLplexIVD_Analysis4_v1x ² AMLplexIVD_Analysis7_v1x ³	vagy magasabb verziók
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 Alleles	
	Table for 10 Alleles	

*Ezeket a templatokat mindig használni kell az adatelemzéshez. Más templatfájlok használata opcionális.

MEGJEGYZÉS



Importálás és allélelhívás a megadott templatfájlokkal csak a GeneMapper™ ID-X software használata esetén garantált. A GeneMapper™ software alkalmazásakor importálási problémákat tapasztalhat egyes templatfájlok esetében. Előfordulhat, hogy az alléllétra egy vagy több futtatásával a Panels és a Bins módosítása válik szükségessé a specifikus műszerbeállításra. Támogatásért lépjen velünk kapcsolatba (support@biotype.de).

Táblázat 12 Adatelemzési munkafolyamat a GeneMapper™ ID-X segítségével

Sorszám	Ikon	Műveleti lépés										
1	Szoftver-előkészítés											
		Panel Manager A rendelkezésre álló templátfájlok importálása a következőkhöz: Panels és Bins.										
		GeneMapper™ ID-X Manager A rendelkezésre álló templátfájl importálása a következőkhöz: Analysis Method és Size Standard										
2	Minta importálása											
		Add Samples to Project – Keresse meg a futtatási mappát, válassza ki, majd: Add to List → Add										
3	Mintaelemzés											
		Válassza ki a következő tulajdonságokat a mintalap megfelelő oszlopaiban, majd válassza az Analyze . lehetőséget.										
		<table><tr><th>Oszlop neve</th><th>Kiválasztás</th></tr><tr><td>Sample Type</td><td>Alléllétra, pozitív kontroll, negatív kontroll vagy minta</td></tr><tr><td>Analysis Method</td><td>Válassza ki a korábban importált BIOTYPE templátot: AMLplexIVD_Analysis_v1x</td></tr><tr><td>Panel</td><td>Válassza ki a korábban importált BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x</td></tr><tr><td>Size Standard</td><td>Válassza ki a korábban importált BIOTYPE template BTO_60-550_v1x</td></tr></table>	Oszlop neve	Kiválasztás	Sample Type	Alléllétra, pozitív kontroll, negatív kontroll vagy minta	Analysis Method	Válassza ki a korábban importált BIOTYPE templátot: AMLplexIVD_Analysis_v1x	Panel	Válassza ki a korábban importált BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x	Size Standard	Válassza ki a korábban importált BIOTYPE template BTO_60-550_v1x
Oszlop neve	Kiválasztás											
Sample Type	Alléllétra, pozitív kontroll, negatív kontroll vagy minta											
Analysis Method	Válassza ki a korábban importált BIOTYPE templátot: AMLplexIVD_Analysis_v1x											
Panel	Válassza ki a korábban importált BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x											
Size Standard	Válassza ki a korábban importált BIOTYPE template BTO_60-550_v1x											
4	Kontrollok ellenőrzése											
	 	Ellenőrizze a kontrollok érvényességét (alléllétra, pozitív kontroll, negatív kontroll) Megfelelő csúcsmagasságok esetén a kijelölés az Analysis Method előírásai szerint történik.										
5	Mintaértékelés											

Sorszám	Ikon	Műveleti lépés
		Ellenőrizze a minta érvényességét. Megfelelő csúcsmagasságok esetén a kijelölés az Analysis Method előírásai szerint történik.

MEGJEGYZÉS

i

Az Analysis Method, Bins, Panels esetében rendelkezésre álló templátfájlokat használva és a megfelelő mintatípus kiválasztásával a szoftver automatikusan ellenőrzi a minták érvényességét. Az SOS (Sample off-Scale), SQ (Sizing Quality), OMR (Outside Marker Range) minőség-ellenőrzési jelölőknek zöld négyzettel kell megjeleníteniük az érvényességi kritériumok teljesítéséhez.

ARNM	SOS	SQ	SSPK	MIX	OMR	CGQ
						

MEGJEGYZÉS

i

A mintaszabvány értékeléséhez a GeneMapper™ ID-X -ben található Size Match Editor használandó. Ha az automatikus fragmentumlehívás megíúsult, a 80 / 90 / 100 bp és 240 / 250 / 260 bp triplettek a manuális csúcskijelölés során tájékozódásra használhatók.

Hibaelhárítás

A pontos és megbízható célpontdetektálás érdekében a poszt-PCR elemzést – beleértve az automatikus célpontkijelölést és -validálást – a validált GeneMapper ID-X software szoftverrel és a BIOTYPE templátfájljaival kell elvégezni. Bármilyen bizonytalanság esetén, kérjük, lépjen velünk kapcsolatba a support@biotype.de címen.

Felhúzódo csúcsok

Ha a csúcsmagasságok a lineáris detektálási tartományon kívül esnek, vagy ha helytelen mátrixot alkalmaztak, előfordulhat, hogy a csúcsok felhúzódnak. Más színcsatornák meghatározott csúcspozícióiban jelennek meg, jellemzően alacsonyabb jelintenzitással. Ezt a hatást figyelembe kell venni a következő célpontok magas amplifikálási profilja esetén:

- PML::RARA_bcr3 (sárga csatorna) felhúzódo csúcsot hoz létre a KMT2A::ELL_e10e2 esetében (zöld csatorna)
- RUNX1::RUNX1T1 (kék csatorna) felhúzódo csúcsot hoz létre a KMT2A::MLLT4 esetében (zöld csatorna, csak POP-7TM Polymer használata esetén)

Nukleotidok templátfüggetlen hozzáadása

Terminális transzferázaktivitása miatt a Multi Taq 2 DNA Polymerase hajlamos hozzáadni egy adenozingyököt az amplifikált DNA-fragmentumok 3'-végéhez. Az artefaktumcsúcs egy bázissal rövidebb a vártnál. Az összes BIOTYPE primer úgy lett tervezve, hogy minimalizálja ezeket az artefaktumokat. Az artefaktumképződés tovább csökkenthető a PCR-protokoll végső kiterjesztési lépésének opcionális meghosszabbításával 68 °C-on, 60 percig. Az artefaktum csúcsmagassága korrelál a cDNA mennyiségével. A laboratóriumoknak meg kell határozniuk a csúcsok elemzésére vonatkozó egyedi határértékeket.

Artefaktumok

A helyiség-hőmérséklet befolyásolhatja a PCR-termékek teljesítményét a többkapillárisos műszereken, és előfordulhatnak vállcsúcsok vagy osztott csúcsok. Ezenkívül az automatikus kijelölés bizonyos esetekben befolyásolható. Ha ezek a hatások jelentkeznek, javasoljuk, hogy injektálja

újra a mintát magasabb helyiség-hőmérsékleten. Mindig fontolja meg friss fogyóeszközök használatát a gyártó ajánlásainak megfelelően.

Polimerek hatása

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit validált, és tanúsítvánnyal rendelkezik a POP-4TM polymer polimeren való analízis elvégzésére. Más polimerek (pl. POP-7TM vagy POP-1TM) használata is kapott hitelesítést, azonban befolyásolhatja a specifikus PCR-termékek futási viselkedését. Továbbá a szabad fluoreszkáló színezékek eltérő viselkedése miatt növekedhet a háttérzaj.

Pipettázási eltérések

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit stabilitási elemzése arra az eredményre jutott, hogy a készlet stabilan viselkedik a leírt protokolltól való kisebb mértékű (+/- 10 %-os) eltérésekkel szemben. A leírt kísérleti protokolltól való közepes (+/- 20 %-os) eltérés kritikusabb lehet az analízis szempontjából. A PCR-komponensek -20 %-os közepes eltéréseire feltétlenül figyelni kell, mivel jelentősen csökkentik a jelmagasságot. A legérzékenyebb célpont ebben az összefüggésben a KMT2A::MLLT4 és a DEK::NUP214.

Az eltérések minimalizálása érdekében kalibrált pipetták használata, pontos pipettázás és alapos keverés ajánlott.

Kis ABL-kontrollcsúcsok

Az ABL belső kontroll képezi a Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit leghosszabb amplikonját, és ezért alapvető minőség-ellenőrzési markernek minősül. Kis ABL-control csúcsmagasság esetén a következő okok egyike a legvalószínűbb:

A reakcióban túl alacsony a templátbevitel: kérjük, határozza meg az RNA-koncentrációt, és szükség esetén növelje a cDNA-szintézis beviteli értékét.

A fragmentált RNA, azaz a célpontokból származó kisebb amplikonok pozitívak lehetnek, de az ABL belső kontroll hiányzik. Ellenőrizze a minta-előkészítési munkafolyamatot RNase-szennyeződés szempontjából. Ismert, hogy az RNA-fragmentáció előfordul archivált mintaanyagokban.

Nem hatékony cDNA-szintézis: biztosítsa a gyártói utasításoknak való megfelelést a cDNA-szintézis során. A validált cDNA-szintézis készleteinek egyikét használja a Átírás cDNA-be című fejezetben leírtak szerint.

A mintát aktív reverz transzkriptáz enzim veszélyezteti: tartsa be a gyártó utasításait, különös tekintettel a cDNA-szintézis során végzett termikus inaktiválási lépésre.

További amplikonok vagy kettős pozitív eredmények

A betegminták többsége várhatóan negatív vagy pozitív eredményt mutat egy transzlokációra vonatkozóan. Egynél több transzlokáció nem megfelelő eredmény, és további ellenőrzést igényelhet. Néhány kombinációt azonban már korábban is sikerült megfigyelni betegmintákban, például a következőket:

A BCR::ABL_b2a3 célpont viszonylag kis csúcsmagassággal jelenhet meg az ABL-control vagy a BCR::ABL bármely más transzkriptumvariánsának erős amplifikációja esetén (a fő célpontra vonatkozó eredmény kb. 5-10 %-a).

A KMT2A partial tandem domain (KMT2A-PTD) ismerten más transzlokációkkal egyidejűleg és olyan komplex átrendeződésekben fordul elő, amelyek egynél több KMT2A-PTD-variáns tekintetében is pozitívnak tűnhetnek.

POP7TM-Polymer használata esetén a CBFB::MYH11_Type A transzlokáció a RUNX1::RUNX1T1 és a CBFB::MYH11_Type F tekintetében nem specifikus jelet indukálhat. A RUNX1::RUNX1T1 csúcs kijelölése a POP4 polimer használata esetén a létrán kívül történik, és ezt az ME-1 sejtvonalon lehetett ellenőrizni. Mindkét nem specifikus oldalcsúcs kisebb RFU csúcsmagasságot mutat, mint a CBFB::MYH11_Type A. POP7TM-Polymer használata esetén a 2000 RFU alatti csúcsmagasságú, nem specifikus, a létrán kívüli csúcs kijelölése transzlokációs CBFB::MYH11_Type I formában történhet.

A KMT2A::MLLT4 célpont a transzkriptumvariánsok mintaspecifikus prevalenciájától függően két különböző amplikonhosszúsággal fordul elő. A legtöbb betegmintában mindkét amplikon három nukleotid hosszkülönbséggel, kettős csúcsként jelenik meg a KMT2A::MLLT4

célponttartományban. Ez érvényes eredmény, nincs szükség korrekciós intézkedésekre.

Bármely KMT2A transzlokáció előfordulhat oly módon, hogy a töréspont a 9. exonban (leggyakoribb) vagy a 10. és 11. exonban (ritka) található. A zöld csatornában a létrán kívüli erős csúcsok atipikus KMT2A transzlokációból származhatnak, és más módszerekkel ellenőrizhetők.

A KMT2A::MLLT3 célpont 6A transzkriptumvariánsa két detektálható amplikont eredményezhet nagyon magas bevitel és nagyon magas RNA-minőség esetén, a megfelelő csúcsok a 6A_S (short, kötelező) és a 6A_L (long, opcionális). Ez a Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit primerek tervezésének szükségszerű velejárója. Ez érvényes eredmény, nincs szükség korrekciós intézkedésekre.

A sárga csatornában a PML::RARA_bcr1 és bcr3 tartományok között található, létrán kívüli csúcs valószínűleg a PML::RARA_bcr2 egyik variánsának tulajdonítható. Ez a célpont több törésponttal is rendelkezik a PML 6. exonjában, és ezért nem rendelhető hozzá specifikus tartomány.

A teljesítőképesség értékelése

Analitikai érzékenység

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit készlet mintatípusa definíció szerint a perifériás vénás teljes vérből vagy a csontvelőből felszívott mintából izolált celluláris RNA-ból átvitt cDNA. A vérmintában lévő RNA az 50 ng és 1000 ng közötti tartományban az ABL-kontroll megfelelő csúcsmagasságával mérhető, a teljesítőképesség-értékelés során validált cDNA synthesis kits SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) és High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével. 100 %-os transzkripció hatékonyságot feltételezve ez 2,5 ng/μL és 50 ng/μL közötti cDNA-koncentrációt eredményez; a PCR reakcióban 1 μL cDNA-t használunk. A csontvelőmintában lévő RNA az 50 ng és 1000 ng közötti tartományban a SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific), míg a 100 ng és 1000 ng közötti tartományban a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) használatával mérhető, az ABL-kontroll megfelelő csúcsmagasságával. 100 %-os transzkripció

hatékonyságot feltételezve ez 2,5 ng/μL, illetve 5 ng/μL és 50 ng/μL közötti cDNA-koncentrációt eredményez; a PCR reakcióban 1 μL cDNA-t használunk. Az optimális RNA-bevitel definíció szerint perifériás teljesvérminta esetében 1000 ng, csontvelőmintáknál 500 ng. Nagyon kis RNA-koncentrációjú minták vagy kritikus célpontok esetében a cDNA-bevitel a PCR-ben a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) készlettel átirrt cDNA esetében a minta típusától függetlenül 4 μL-re növelhető. A SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific készlettel átirrt cDNA esetében a cDNA-bevitel legfeljebb 2 μL-re van korlátozva.

A Limit of Blank (LoB) értékét 12 különböző eredetű mintán teszteltük a korábban meghatározott optimális beviteli mennyiséggel. Mivel a 12 vizsgált minta egyikében sem észleltünk 400 RFU csúcsmagasságú küszöbérték feletti nem specifikus csúcsokat az 55 bp és 550 bp közötti tartományban, 400 RFU küszöbérték adható meg.

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit Limit of Detection (LoD) értékét 6 mesterséges, cDNA-hátterű mintával teszteltük, a primerkeverékben lévő összes primerpárra kiterjedően; az egynél több célpontot detektáló primerpárok a leghosszabb és ezért legnehezebben detektálható célpont-transzkriptumvariánst amplifikálják.

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit az elfogadási kritériumoknak megfelelően elfogadható kimutatási határt mutatott, a vizsgált célpontok esetében legfeljebb 400 másolati LoD-vel (lásd: Táblázat 13), a KMT2A::MLLT4 kivételével, amely 1000 másolati LoD-vel még mindig elfogadható eredményt szolgáltatott. Mivel a kimutatható génfúziók nem minden transzkriptumvariánsát tudtuk tesztelni, a vizsgált célpontok közül a legmagasabb eredményt szolgáltató, 1000 másolatos általános LoD-t biztonságosan alkalmazhatónak feltételezzük.

Táblázat 13 LoD a Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit készlethez.

Minta	Célpont	LoD [másolatok]
1. minta	CBFB::MYH11_TypeJ	200
	BCR::ABL_e1a2	200
	CBFB::MYH11_TypeB	200
	KMT2A-PTD_e11e3	200
	PML::RARA_bcr1	400
2. minta	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
3. minta	CBFB::MYH11_TypeG	200
	BCR::ABL_b2a3	100
	CBFB::MYH11_TypeE	200
	KMT2A::ELL_e10e3	100
4. minta	CBFB::MYH11_TypeI	200
	MLLT10_240::PICALM_2092	200
	RUNX1::RUNX1T1	400
	DEK::NUP214	200
5. minta	KMT2A::MLLT4 (short)	1000
6. minta	KMT2A::MLLT4 (short)	500
	KMT2A::MLLT4 (long)	500

Mivel a Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit egy, a célanalít jelenlétének vagy hiányának meghatározására tervezett kvalitatív vizsgálat, a Limit of Quantitation (LoQ) vizsgálata nem tekinthető relevánsnak a célzott felhasználás szempontjából.

Analitikai specificitás

Teszteltük az automatikus allélelhívást az alléllétrával és az allél-hozzárendelés konkordanciáját a transzlokációs célpontok mesterséges mintáival összehasonlítva, a GeneMapper™ ID-X software segítségével. Az eredmények alapján meghatározzuk a genotipizáláshoz szükséges testspecifikus eszközbeállításokat a Genetic Analyzer kapilláris gélelektroforézisével (bins és panels).

A PCR-primereket úgy tervezték, hogy komplementer módon kötődjenek a hivatalos humán genom referencia-DNS-szekvenciához. Az olyan genetikai variánsok, mint a Single Nucleotide Polymorphism (SNPs, INDELs vagy deléciók) befolyásolhatják a specifikus primerkötődést, és ezeket a Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit szempontjából releváns dbSNP-bejegyzések alapján értékeltük. Egy bejegyzés (rs73504425) a primer funkció elvesztését okozza. A variáns allél az afrikai populáció 0,6 %-ánál fordul elő, és a PICALM::MLLT10 primer kötőhelyén belül található; egy ritkán jelentett fúziós génről van szó, amelynek prevalenciája 1 % alatti.

Továbbá BLAST keresést végeztünk a Mentype® AMLplex^{QS} Primer mix humán transzkriptomában, és nem találtunk nem specifikus amplifikálási termékeket a 0–600 bp tartományban.

Pontosság és valódiság

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit analitikai pontossága a készlet valódiságvizsgálatainak eredményein alapul. 2013 óta a BIOTYPE GmbH aktívan vesz részt egy External Quality Assessment (EQA) programban. A transzlokáció jelenléte vagy hiánya a mintákban az adott EQA összes vizsgálati résztvevője eredményeinek konszenzusából állapítható meg. 2013 óta összesen 68 minta elemzésére került sor.

Ezen eredmények alapján egy kontingenciamátrixot hoztunk létre a Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit készlettel kapott eredmények (pozitív/negatív) és a valódi eredmények (pozitív/negatív) összehasonlítása alapján, amelyet a External Quality Assessment program összes résztvevőjének konszenzusa megerősített. A CLSI EP12 (3. kiadás) alapján a Táblázat 14 feltüntetett kulcsfontosságú teljesítőképességi mutatókat a kontingenciamátrix alapján számítottuk ki.

Táblázat 14 A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit. analitikai jellemzői

Analitikai jellemzők	Becslés	Alsó 95%-os konfidenciaintervallum	Felső 95%-os konfidenciaintervallum
Analitikai érzékenység	92,2 %	81,5 %	96,9 %
Analitikai specificitás	94,1 %	73,0 %	99,0 %
Pozitív prediktív érték	97,9 %	89,1 %	99,6 %
Negatív prediktív érték	80,0 %	58,4 %	91,9 %
Pontosság	92,6 %	83,9 %	96,8 %

Ezek a számítások átfogó mérést szolgáltatnak a Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit pozitív és negatív esetek helyes osztályozására vonatkozó képességéről, 92 %-os, ill. 94 %-os valószínűséggel. A helyes eredmények általános aránya 93 %, ami nagy fokú megbízhatóságot mutat. A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit magas analitikai teljesítőképességet mutat, ami validálja a vizsgálat hatékonyságát és megbízhatóságát.

Precizitás

A vizsgálat megismételhetőségét és reprodukálhatóságát az ISO 5725-2:2022-05 és a CLSI EP05 (3. kiadás) alapján értékeltük. Öt mesterséges mintát és a Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control készletet egy 5 x 5 x 3-as (nap x ismétlés x helyszín), több helyszínű vizsgálatban értékeltük. A több helyszínű vizsgálat a különböző vizsgált helyszínekből adódó fő variációs forrást (ismételhetőség és reprodukálhatóság) vizsgálja, amely különböző helyszíneken mérő, különböző műszereket használó különböző kezelőket jelent. Az így kapott ismételhetőség 8,3 %CV és 15,6 %CV, a reprodukálhatóság pedig 14,6 %CV és 30,5 %CV között mozgott. Összességében a Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit elfogadható pontosságot mutat $SD_{Rep} \leq 2500$ RFU kritériummal az 1–5. mesterséges mintával vizsgált összes specifikus génfüzió és a Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control esetében.

A vizsgálat határértéke

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit a génfúziók kvalitatív kimutatását végponti PCR-rel végzi. Ennélfogva a vizsgálat egyik releváns határértéke az a minimális csúcsmagasság, amely biztonságosan megkülönbözteti a technikai háttérzajt a valódi célpontdetektálástól. Az RFU-csúcsmagasság határértékét 400 RFU-nál határoztuk meg az analitikai érzékenység vizsgálat adatai alapján.

Zavaró tényezők (interferensek) és keresztreakciók

A mérési eljárás eredményeit esetlegesen befolyásoló potenciális zavaró tényezőket az EP07 (3. kiadás) és az EP37 (1. kiadás) CLSI-iránymutatások ajánlásainak megfelelően értékeltük. A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit esetében meghatároztuk az endogén és exogén zavaró tényezőket, megvizsgáltuk a PCR-reakcióban várható maximális koncentrációjukat (C_{max}) az iránymutatásokban javasoltak szerint, és interferencia észlelése esetén további koncentrációkat vizsgáltunk azon koncentráció meghatározására, amelynél már nem detektálható interferencia.

Az eredmények azt mutatták, hogy a PCR-reakcióban vizsgált 1 ng endogén interferens DNA-nek nincs zavaró hatása, ha a DNA-roncsolást a mintafeldolgozás részeként végeztük.

Mivel az endogén interferens vér esetében a PCR-reakcióban 0,87 % (V/V) számított C_{max} koncentrációnál interferenciát észleltünk, további hígításokat teszteltünk, amíg már nem volt detektálható interferencia. A vér 0,087 % (V/V) koncentrációban nem mutatott interferenciát. A vérszennyezés azonban vizuálisan kimutatható a PCR-reakcióban, vagy az izolált RNA-szuspenzióban narancssárga színváltozás jelzi. Színváltozás észlelése esetén javasoljuk, hogy ismételje meg a RNA-izolálást, hogy elkerülje a lehetséges interferenciát.

A DTT, RNase Inhibitor, DNase, Ethanol, Metoclopramide, EDTA, Hydroxyurea és Citrate exogén interferensek esetében nem észleltünk interferenciát a megfelelő C_{max} értékeknél – a vizsgált minták esetében a kezeletlen csoporttól való megfigyelt eltérések az elfogadott határértékeken belül voltak.

Mivel az exogén interferens reverz transzkriptáz, heparin és proteináz K esetében interferenciát észleltünk a számított vagy a CLSI EP37 (1. kiadás) által ajánlott $C_{\max}$ értékeknél, további hígításokat vizsgáltunk, amíg már nem volt detektálható interferencia. A reverz transzkriptáz enzim esetében a vizsgált 0,2 % (V/V) $C_{\max}$ koncentráció interferenciát mutatott, kivéve, ha az enzimet a vizsgált cDNA-szintéziskészletek gyártói utasításai szerint termikusan inaktiváltuk. A heparin esetében 3,3 U/dl, a proteináz K enzim esetében pedig 0,0001 % (V/V) koncentrációnál nem jelentkezett interferencia.

A véralvadásgátló szereket (EDTA, nátrium-citrát és heparin) az ajánlott izolációs készletekkel további vizsgálatoknak vetettük alá. Az analitikai teljesítőképességre gyakorolt hatást nem tudtunk kimutatni. Arra számítottunk, hogy az izolációs készletek munkafolyamata hatékonyan eltávolítja majd a véralvadásgátlókból és az RNA-izolációs reagensekből származó, vizsgált zavaró anyagokat.

Táblázat 15 Endogén és exogén interferensek nem zavaró koncentrációinak vizsgálata.

Interferens típusa	Kategória	Interferens	Nem interferáló vizsgált koncentráció
Endogén	A teljes vér komponensei	Teljes vér	0,087 % (V/V) PCR-reakcióban
Exogén	Véralvadásgátlók	EDTA	0,099 mg/dl
		Citrát	0,004 % (V/V) PCR-reakcióban
		Heparin	3,3 U/dl
	RNA-izoláló reagensek	Proteinase K	0,0001 % (V/V) PCR-reakcióban
		Etanol	0,3 % (V/V) PCR-reakcióban
		DNase	0,16 % (V/V) PCR-reakcióban
	cDNA reverz transzkriptáz reagensek	DTT	0,2 % (V/V) PCR-reakcióban
		RNase Inhibitor	0,2 % (V/V) PCR-reakcióban

Interferens típusa	Kategória	Interferens	Nem interferáló vizsgált koncentráció
		Reverz transzkriptáz	0,2 % (V/V) PCR-reakcióban (termikusan inaktívált)
	Antiemetikus szer	Metoclopramide	0,225 mg/dl
	Daganatellenes szer	Hydroxyurea	3,08 mg/dl

Használat közbeni stabilitás

Minden stabilitási vizsgálatot az ISO 23640:2015 szabvány és a CLSI EP25-iránymutatásnak (2. kiadás) megfelelően terveztünk meg. A stabilitási vizsgálatoknál az alábbi eljárást alkalmaztuk: A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit készletet több időpontban, különböző időtartamokon keresztül vizsgáltuk. Analizáltuk a mesterséges mintákat és a Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control készletet. A különböző körülmények végső értékelése magában foglalta a kiindulási időpont (T_0) és a későbbi időpontok (T_n) átlagainak összehasonlítását, és a következő egyenlet segítségével számítottuk ki:

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

A használat közbeni stabilitás vizsgálatához két kísérletet végeztünk. Az egyik a több fagyasztási és felolvasztási ciklust követő stabilitásvizsgálat, a másik pedig a készletek stabilitásának vizsgálata a felbontást követő szimulált használat során a fagyasztási és felolvasztási, valamint az állítólagos eltarthatósági stabilitási vizsgálat részeként.

Az eredmények alapján a Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit akár 20 fagyasztási és felolvasztási cikluson keresztül is stabil, és felbontás után akár 24 hónapig is felhasználható.

A klinikai teljesítőképességre vonatkozó adatok

A vizsgálat megtervezése, etikai és szabályozási szempontok

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit készletet és a referencia-módszereket 297 betegmintán és 10 egészséges önkéntes személyen teszteltük. A vizsgálat célja az volt, hogy az orvostechikai eszközökről szóló német törvény (Medizinproduktegesetz) 20–24. §-a szerinti klinikai bizonyítékot szolgáltatasson. A citogenetikai (FISH) és a belső validált monoplex-qPCR referencia-módszerek segítségével kellett bizonyítani az eszközzel való kompatibilitást. A felelős etikai bizottság megerősítése 2012. június 6-án érkezett meg.

Referencia-módszerek

Az elsődleges cél a diagnosztikai érzékenység és specificitás meghatározása a referencia-módszerekkel összevetve. Referencia-módszerként standardizált Fluorescence-In-Situ-Hybridization (FISH)-t végeztünk a kiválasztott transzlokációkra [Grimwade *et al.* Blood 116: 354-65, 2010]. A citogenetikai módszerrel nem kezelhető transzlokációkat a vizsgálólaboratóriumban létrehozott és validált monoplex-nested-PCR-tesztekkel vizsgáltuk [Steudel *et al.* Genes Chromosomes Cancer 37: 237-51, 2003, van Dongen *et al.* Leukemia 13: 1901-28, 1999].

RNA-kivonás és -tisztítás

A mintákból sűrűséggradiens-centrifugálással mononukleáris sejteket (MNC) gyűjtöttünk. Ezt követően a teljes RNA-izolálást és a cDNA-re történő reverz transzkripciót a kereskedelmi forgalomban kapható készletekkel végeztük el. A cDNA minőségét valós idejű PCR-vizsgálattal elemeztük. A fúziós gének és mutációk megerősítésére validált egyedi PCR-vizsgálatok szolgáltak.

Eredmények

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit nem mutatott hamis pozitív eredményt a 10 egészséges önkéntesnél vizsgált cDNA tekintetében.

A 297 vizsgált betegmintából 5-öt nem lehetett értékelni, mivel a belső ABL-kontrollt az ajánlott küszöbérték alatt sikerült detektálni. A fennmaradó 292

mintából 201 valódi negatív eredményt szolgáltatott a referencia-módszerekkel összehasonlítva.

Az összehasonlító vizsgálatok egyedi eredményeit a Táblázat 16 foglalja össze. A PICALM::MLLT10 (CALM-AF10) és KMT2A::MLLT4 (MLL-AF6) génfüziókat nem lehetett értékelni diagnosztikai érzékenység szempontjából, mivel nem álltak rendelkezésre pozitív, előzetesen jellemzett minták.

Összességében 94%-os diagnosztikai érzékenységet és 99,5 %-os diagnosztikai specificitást sikerült elérni.

Táblázat 16 Következtetés a Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit klinikai teljesítőképességi adatainak eredményeivel kapcsolatban
***A prevalenciaadatok forrása: Grimwade et al. 2010. n.e. = értékelés nélkül**

Génfüzió	Krom. rendelle nesség	Variáns	Prevalenci a* [%]	Valódi pozitív	A klinikai teljesítőképesség értékelése (n = 292)				Diagnosztikai érzékenység [%]	Diagnosztikai specificitás [%]
					Valódi negatív	Hamis pozitív	Hamis negatív			
RUNX1:: RUNX1T1	t(8;21) (q22;q22)	n. b.	7	16	275	0	1	94,1	100,0	
BCR::ABL	t(9;22)	e1a3	1	1	291	0	0	100,0	100,0	
	(q34;q11)	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)	A típus	5	28	262	0	2	93,3	100,0	
	(p13;q22)	B típus								
		C típus								
		D típus								
		E típus								
		F típus								
		G típus								
		H típus								
		J típus								
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)	6A (6A_S; 6A_L)	1	4	287	0	1	80,0	100,0	
	(p22;q23)	7A								
		8A								
		6B								

Génfűző	Krom. rendellenesség	Variáns	Prevalencia [%]	Valódi pozitív	A klinikai teljesítőképesség értékelése (n = 292)				
					Valódi negatív	Hamis pozitív	Hamis negatív	Diagnosztikai érzékenység [%]	Diagnosztikai specificitás [%]
KMT2A::ELL1	t(11;19)(q23;p13)	e10e2 e10e3	1	0	290	1	1	0,0	99,7
	KMT2A-PTD Részleges Tandem Duplikáció	e9e3 e10e3 e11e3	5–7	23	269	0	0	100,0	100,0
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)(q22;q21)	bcr1 bcr2 bcr3	13	8	284	0	0	100,0	100,0
Összegzés			37	85	201	1	5	94,4	99,5

Diagnosztikai értékelés

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit jellemzőinek klinikai teljesítőképessége elfogadható eredményeket szolgáltatott. A klinikai teljesítőképességre vonatkozó értékelés paramétereit az in vitro diagnosztikai orvostechinikai eszközökről szóló (EU) 2017/746 rendelet I. mellékletének 9.1b. pontja szerint számítottuk ki, amint azt a Táblázat 17 szemlélteti.

Táblázat 17 A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit diagnosztikai jellemzői

Diagnosztikai jellemző	Becslés	Alsó konfidenciaintervallum	Felső konfidenciaintervallum
Diagnosztikai érzékenység	94,4 %	87,7 %	97,6 %
Diagnosztikai specificitás	99,5 %	97,3 %	99,9 %
Pozitív prediktív érték	98,8 %	93,7 %	99,8 %
Negatív prediktív érték	97,6 %	94,4 %	99,0 %
Diagnosztikai pontosság	98,0 %	95,6 %	99,1 %

Minőség-ellenőrzés

A BIOTYPE GmbH-nál valamennyi készletkomponens intenzív minőségbiztosítási folyamaton esik át. A tesztkészletek minőségét a korlátlan használhatóság biztosítása érdekében folyamatosan ellenőrzik. Kérjük, vegye fel velünk a kapcsolatot, ha bármilyen kérdése van a minőségbiztosítással kapcsolatban.

Technikai segítségnyújtás

Technikai tanácsadásért forduljon ügyfélszolgálati csapatunkhoz:

e-mail: support@biotype.de

telefonszám: +49 (0)351 8838 400

Hivatkozások

Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K, Kamada N (1991) Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. 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)

Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)- a Europe against cancer program. Leukemia 17:2474-2486.

Schnittger S, Kinkelin, Schoch U, Heinecke, A, Haase D, Haferlach T, Büchner T, Wörmann B, Hiddemann W & Griesinger F (2000) Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. Leukemia 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) Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease -

Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. Leukemia 13:1901-1928.

A felhasználás korlátozása

- A jelen kézikönyvben leírtak szerint kell eljárni. Bármely eltérés vizsgálati hibát vonhat maga után, vagy téves eredményeket okozhat.
- A termék használata kizárólag a PCR-technika és a kapilláris gélelektroforézis területén speciális betanításon részt vett laboratóriumi szakemberek számára engedélyezett.
- A vizsgálat optimális elvégzéséhez megfelelő mintagyűjtési, -szállítási, -tárolási és -feldolgozási eljárásokra van szükség.
- Ez a vizsgálat nem használható közvetlenül a mintán. E vizsgálat lefolytatása előtt megfelelő nukleinsav-extrakciós módszereket kell alkalmazni.
- A készletet csak a Szükséges, de a készletben nem megtalálható anyagok és eszközök című fejezetben leírt reagensekkel, műszerekkel és szoftverekkel való használatra validálták.
- A Mentype® AMLplex^{QS} terméket az AML altípus-osztályozására szolgáló szűrési eszközként tervezték, validálták és tanúsították. Ez az alkalmazás nem alkalmas másolatszámok számszerűsítésére, például a Minimal Residual Disease (MRD) monitorozására, illetve a leukémiák vagy gyermekgyógyászati AML más altípusainak validálására.
- A genetikai változatosság miatt a single nucleotide polymorphism (SNPs) vagy az insertion deletion polymorphism (INDELs) befolyásolhatja a primer hatékonyságot vagy a templát hozzáférhetőségét. Az emberi genomfelépítés (HG38) legújabb változatának elemzése az összes etnikai csoportra vonatkozóan csak egy kritikus SNP-t talált, amely a primer funkció elvesztését eredményezi. A variáns allél az afrikai populáció 0,6%-ánál fordul elő, és a PICALM::MLLT10 primer kötőhelyén belül található; egy ritkán jelentett fúziós génről van szó, amelynek prevalenciája 1% alatti. Mindazonáltal a génfúzió alacsony prevalenciája és a globális populációban az SNP előfordulásának alacsony valószínűsége miatt a hamis negatív eredmények kockázata alacsony. Bármilyen bizonytalanság esetén, kérjük, fontolja meg az eredmények referencia-módszerek alkalmazásával történő megerősítését.

- A készlet teljesítményének biztosításához jó laboratóriumi gyakorlat szükséges.
- Az eredményeket képzett egészségügyi szakembernek kell értelmeznie.
- Az eredmények értelmezésénél figyelembe kell venni a hamis negatív és hamis pozitív eredmények előfordulásának lehetőségét.
- Ne használjon lejárt vagy helytelenül tárolt komponenseket.

Rendelési információk

Rendeléseit e-mailben a sales@biotype.de címre küldje el.

Termék	Csomagolási méret	Megrendelési szám
Mentype® AMLplex ^{QS} PCR Amplification Kit	25 reakció	45-12100-0025
	100 reakció	45-12100-0100
	400 reakció	45-12100-0400
Matrix Standard BT5 multi	1 x 25 µL	45-15100-0025
	2 x 25 µL	45-15100-0050

Védjegyek és felelősséget kizáró nyilatkozatok

A Mentype® a BIOTYPE GmbH bejegyzett védjegye.

Egyéb védjegyek: ABI PRISM®, GeneMapper®, SuperScript™, GeneAmp® és Applied Biosystems® (Applied Biosystems LLC group); QIAamp® (Qiagen); POP-4™, POP-1™, POP-7™ (Europe: Applied Biosystems LLC, US: Life Technologies Corporation). A PCR-t szabadalmak védik. A szabadalom tulajdonosai a Hoffmann-La Roche Inc. és az F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Az ebben a dokumentumban használt bejegyzett nevek, védjegyek stb. külön megjelölésük nélkül sem minősülnek úgy, hogy azokat a vonatkozó törvények nem védik.

A Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit az in vitro diagnosztikai orvostechikai eszközökről szóló (EU) 2017/746 európai parlamenti és tanácsi rendelet szerint CE-jelöléssel ellátott diagnosztikai készlet.

A termék nem rendelkezik Health Canada engedéllyel, és nem rendelkezik az FDA jóváhagyásával vagy engedélyével.

Nem minden országban érhető el.

© 2025 BIOTYPE GmbH; minden jog fenntartva.

A szimbólumok magyarázata



Gyártó



Gyártási tétel kódja



<N> teszt elvégzéséhez elegendő reagenst tartalmaz



Olvassa el az elektronikus használati utasítást



Felhasználhatósági idő



Hőmérséklet-határérték



Katalógusszám



In vitro diagnosztikai orvostechikai eszköz



Napfénytől távol tartandó



Szárazon tartandó



Unique device identifier

A jelen használati utasításban használt további jelölések:



Hasznos tippek



Figyelem, feltétlenül kövesse ezt az értesítést!

kék aláhúzott szöveg

Külső tartalmakra mutató hivatkozások, például honlapok, e-mail-címek

fekete aláhúzott szöveg

A dokumentumban található kereszthivatkozások a könnyebb navigáció érdekében

behúzott, kurzív, vastagon szedett szöveg

A szoftverben kattintásra szánt mezők

Függelék

Célzott gének listája

Gén	Alternatív nevek	Transzkripció azonosító
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

Referenciaminták elektroferogramjai

A következő oldalakon a Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder (2), a Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control (PC, 3) és egy templátmentes kontroll (NTC, 4) elektroferogramjaira láthat példákat.

Az összes mintát ProFlex PCR-készüléken amplifikáltuk, és 3500 Genetic Analyzer (POP-4, 36 cm-es tömb) segítségével analizáltuk a validált futtatási paraméterek alkalmazásával. Az adatelemzést az 1.6-os verziójú GeneMapper ID-X szoftverrel (Bins, Panels) végeztük, és a Táblázat 11 szerinti Analysis method módszert alkalmaztuk.

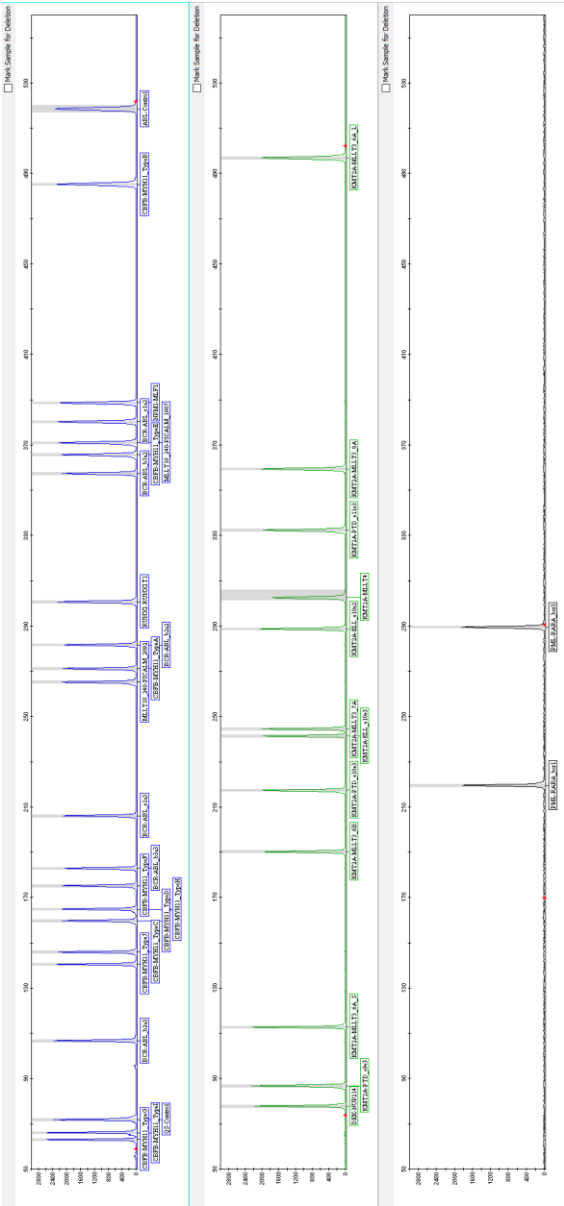
Az elektroferogramokat az 50–560 bp közötti fragmentumhosszra (x-tengely) nagyítottuk. Az y-tengely skálázását egyedileg végeztük:

2, 58: Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder: 3000 RFU

3, 59: Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control: 9000 RFU

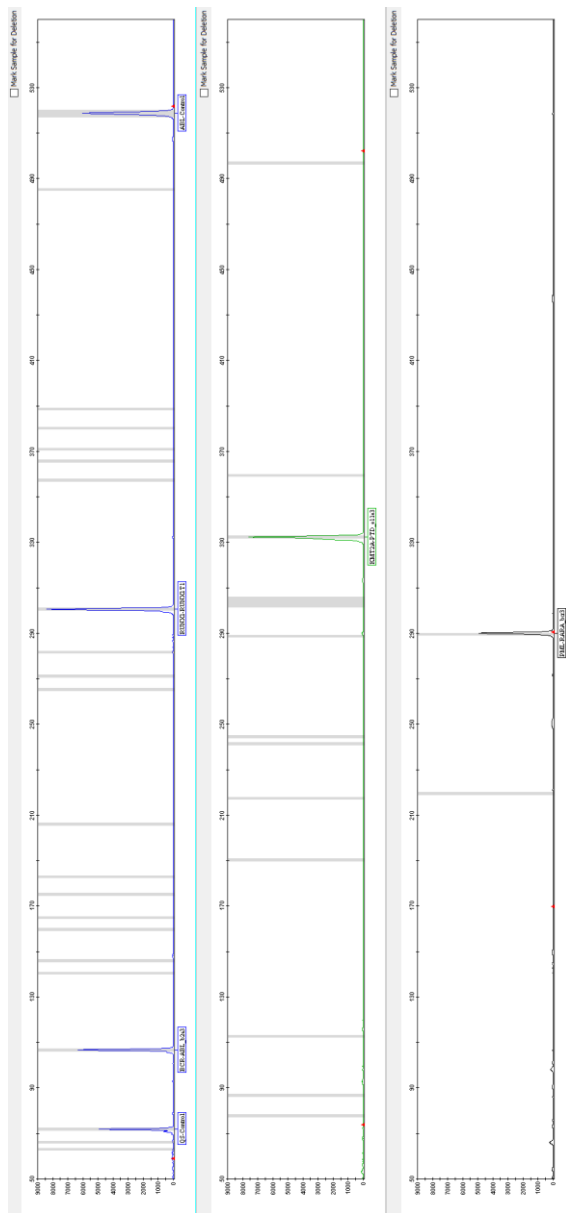
4, 60: Templátmentes kontroll (NTC): 9000 RFU

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder



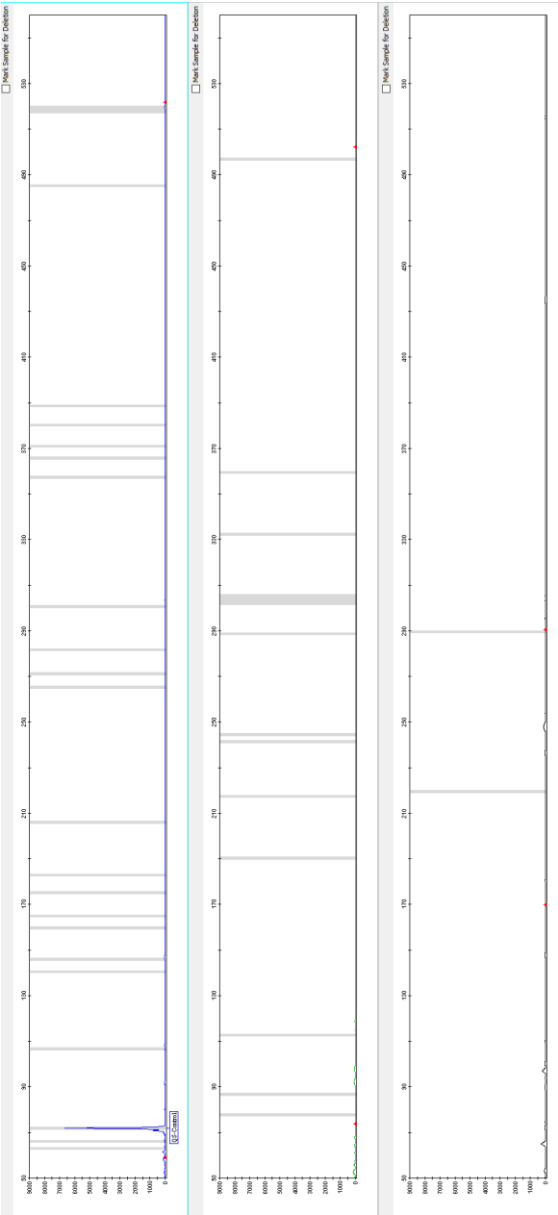
2 Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder

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



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

No template control (NTC)



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

Rendelés

sales@biotype.de

Ügyfélszolgálat és támogatás

support@biotype.de

