

# Mentype<sup>®</sup> AMLplex<sup>QS</sup>

PCR Amplification Kit

## Instrucciones de uso (IFU)



0483

Para uso diagnóstico in vitro.

AMLIFU02v2es  
23.07.2025



45-12100-0025  
45-12100-0100  
45-12100-0400



Código de lote



BIOTYPE GmbH  
Moritzburger Weg 67  
01109 DRESDEN  
GERMANY  
Sitio web: [www.biotype.de](http://www.biotype.de)  
Email: [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)  
Encargos: [sales@biotype.de](mailto:sales@biotype.de)



## Notificación de cambio

Tenga en cuenta las siguientes adaptaciones con respecto a la versión anterior de las instrucciones:

Código del documento	Cambios	Fecha
AMLIFU02v1es	Versión inicial	28.05.2025
<b>AMLIFU02v2es</b>	Actualizar Tabla 8	23.07.2025

Se puede proporcionar una versión impresa de estas instrucciones de forma gratuita en un plazo de 7 días.

Si tiene más preguntas, póngase en contacto con nosotros:

en el +49 351 8838 400 or [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)

# Contenido

<b>Objetivo previsto</b> .....	<b>4</b>
<b>Base científica</b> .....	<b>4</b>
<b>Descripción del producto</b> .....	<b>5</b>
<b>Materiales proporcionados</b> .....	<b>7</b>
<b>Descripción de los componentes</b> .....	<b>8</b>
<b>Almacenamiento y manipulación de reactivos</b> .....	<b>9</b>
<b>Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados</b> .....	<b>10</b>
Equipo general de laboratorio .....	10
Reactivos, kits y consumibles .....	10
Instrumentos y <i>software</i> .....	11
Muestras y muestras de ensayo .....	13
<b>Advertencias y precauciones</b> .....	<b>13</b>
<b>Aviso al usuario</b> .....	<b>15</b>
<b>Procedimiento</b> .....	<b>15</b>
Resumen del flujo de trabajo experimental.....	15
Preparación de muestras .....	16
Preparación del control .....	19
Configuración de la mezcla maestra .....	20
Amplificación de PCR .....	22
<b>Electroforesis capilar en gel</b> .....	<b>23</b>
Preparación de los productos de PCR.....	23
Análisis de la longitud de los fragmentos.....	24
<b>Análisis de datos</b> .....	<b>27</b>
Procedimiento general para el análisis de datos .....	27
Análisis de muestras .....	30
Análisis de datos con GeneMapper™ ID-X .....	33

<b>Solución de problemas .....</b>	<b>36</b>
<b>Evaluación del rendimiento .....</b>	<b>40</b>
<b>Control de calidad .....</b>	<b>50</b>
<b>Asistencia técnica .....</b>	<b>50</b>
<b>Referencia.....</b>	<b>50</b>
<b>Limitaciones de uso .....</b>	<b>51</b>
<b>Información para realizar pedidos .....</b>	<b>52</b>
<b>Marcas comerciales y exenciones de responsabilidad .....</b>	<b>53</b>
<b>Explicación de los símbolos.....</b>	<b>54</b>
<b>Apéndice.....</b>	<b>56</b>

## Objetivo previsto

El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit es un ensayo manual destinado al cribado cualitativo de 11 fusiones génicas con un total de 34 variantes de transcripción, que permite identificar aberraciones cromosómicas con relevancia diagnóstica, pronóstica y terapéutica en pacientes adultos que padecen o se sospecha que padecen leucemia mieloide aguda. (AML).

El ensayo debe utilizarse con DNA (cDNA complementario), que ha sido transcrito inversamente a partir de RNA celular que se extrajo de muestras de sangre venosa periférica o médula ósea.

El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit se utiliza para detectar aberraciones cromosómicas con fines clínicos relevantes en la leucemia mieloide aguda. La identificación de las translocaciones genéticas específicas permite clasificar las enfermedades leucémicas y proporciona información esencial para el diagnóstico que determina el tratamiento dirigido al riesgo de los pacientes.

El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit Está destinado a usuarios profesionales de laboratorio formados en técnicas de genética molecular, PCR multiplex y el manejo de Genetic Analyzer de Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems division).

## Base científica

La verificación de aberraciones cromosómicas específicas tiene un alto valor pronóstico en casi todos los tipos de leucemia aguda. La evidencia biológica molecular de aberraciones cromosómicas (translocaciones) representa un importante complemento diagnóstico. La detección de translocaciones específicas permite clasificar los subtipos de leucemia y proporciona información esencial para el tratamiento de los pacientes en función del riesgo.

El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit facilita la detección de las aberraciones cromosómicas más comunes observadas hasta ahora en AML y representa una herramienta de cribado fácil de usar, compatible con la rutina y fiable.

## Descripción del producto

El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit contiene reactivos optimizados para la detección de alta resolución de 11 genes de fusión con un total de 34 variantes de transcripción (véase la [Tabla 1](#)). La denominación de las variantes sigue nomenclaturas establecidas históricamente, especialmente para KMT2A (Schnittger et al., 2000). En el apéndice se incluye una lista completa de los genes, sus nombres alternativos y los identificadores de transcripción utilizados para las descripciones sistemáticas de las variantes (véase la [Lista de genes diana](#)).

El kit de prueba incluye un control de PCR interno (Quality Sensor “QS-Control”), que es independiente de la plantilla y dependiente de la plantilla de control de cDNA (ABL-Control), proporcionar información útil sobre la eficiencia de la PCR, la calidad de las plantillas de cDNA aplicadas y la presencia de inhibidores de PCR.

La prueba se realiza mediante análisis de fragmentos utilizando electroforesis capilar en gel. Se marca con fluorescencia un cebador por cada transcripción con 6-FAM, BTG o BTY, los espectros de color del accesorio Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE, GmbH).

**Tabla 1 Fusiones génicas y variantes de transcripción detectables con Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit**

Fusión génica	Aberración cromosómica	Variante	Descripción sistemática de variantes
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)	Type A	CBFB:e5::MYH11:e33
		Type B	CBFB:e5::MYH11:e32
		Type C	CBFB:e5::MYH11:e31
		Type D	CBFB:e5::MYH11:e29

Fusión génica	Aberración cromosómica	Variante	Descripción sistemática de variantes
		Type E Type F Type G Type H Type I Type J	CBFB:e5::MYH11:e28 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

El ensayo se validó mediante cribado de fusión génica en unos 300 pacientes de AML y su idoneidad se confirmó en un estudio de evaluación clínica comparativa.

El límite de detección para la evaluación cualitativa es de 400 RFU. De media, se pueden detectar un mínimo de 1000 copias por cada fusión génica.

El rango general de entrada en condiciones estándar en la reacción de transcripción inversa se define como 100 ng a 1 µg RNA total aislado de sangre completa o médula ósea.

La entrada óptima en la transcripción inversa para la médula ósea se define como 500 ng de RNA y 1 µg de RNA para la sangre periférica. 1 µL de cDNA se utiliza posteriormente durante la PCR.

## Materiales proporcionados

**Tabla 2 Contenido del Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit**

Reactivo	Color de la tapa	Volumen por tamaño de envase		
		25 reacciones	100 reacciones	400 reacciones
Nuclease-Free Water	Azul claro	1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Morado	125 µL	500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® AMLplex <sup>QS</sup> Primer Mix	Rojo	63 µL	250 µL	4 x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Blanco	10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® AMLplex <sup>QS</sup> Positive Control	Blanco	25 µL	25 µL	25 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Naranja	13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® AMLplex <sup>QS</sup> Allelic Ladder	Verde	25 µL	25 µL	4 x 25 µL

En la etiqueta situada en el interior de la solapa de la caja se puede encontrar una descripción general de los números de lote de los componentes.

### NOTA

Tenga en cuenta que el tamaño del envase describe el número de pruebas **sin** tener en cuenta el número de controles necesarios ni el exceso necesario para la pipetado.

Recomendamos utilizar el siguiente tamaño para el rendimiento correspondiente:

**i**

- < 8 muestras por ciclo de PCR: Tamaño del paquete de 25 reacciones
- 8 - 45 muestras por ciclo de PCR: Tamaño del paquete de 100 reacciones
- 45 muestras por ciclo de PCR: Tamaño del paquete de 400 reacciones

## Descripción de los componentes

agua de grado **Nuclease-Free Water (Agua libre de nucleasas)**: PCR, usada en la configuración de la PCR y como control sin plantilla (NTC).

Tampón **Reaction Mix A (Mezcla reactiva A)**: PCR que contiene dNTPs y MgCl<sub>2</sub>. El tampón de PCR está optimizado para promover la actividad enzimática para la PCR.

**Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Primer Mix (Mezcla de imprimación)**: Mezcla de cebadores oligonucleótidos multiplex que contiene cebadores marcados (marcador: 6-FAM™, BTG, BTY) y cebadores sin etiquetar.

**Multi Taq 2 DNA Polymerase (Polimerasa)**: Hot start Taq DNA polymerase, 2,5 U/μL.

**Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control (Control positivo)**: mezcla de DNA de doble cadena artificial de cinco fragmentos de DNA. Se utiliza como control cualitativo externo de PCR, que es positivo para los siguientes objetivos en los tres paneles: BCR::ABL\_b2a3, RUNX1::RUNX1T1, ABL-Control, KMT2A-PTD\_e11e3 y PML::RARA\_bcr3. Además, se amplifica el QS-Control como marcador de calidad para la validez de la muestra.

### NOTA



El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control no es fundamental para el profesional de laboratorio, ya que consiste en moléculas DNA que han sido purificadas, no son peligrosas y no tienen funciones biológicas activas. No contiene células vivas ni organismos patógenos que puedan suponer una amenaza directa.

**DNA Size Standard 550 (BTO) (Tamaño estándar)**: mezcla de fragmentos de PCR marcados con fluoróforos con fragmentos de longitud definida entre 60 pb y 550 pb, el componente se añade a cada producto de PCR antes del análisis de la longitud de los fragmentos, se utiliza para una regresión del tamaño con el fin de determinar con exactitud la longitud de los fragmentos de los productos de PCR.

**Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder (Escalera alélica):** a una mezcla de fragmentos de PCR marcados con fluoróforos que representan todos los alelos detectables de Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit. Incluye 22 fragmentos etiquetados con 12 fragmentos de 6-FAM™, etiquetados con BTG y 2 fragmentos etiquetados con BTY, utilizados como referencia genotípica para la identificación exacta de alelos.

## Almacenamiento y manipulación de reactivos

El kit se envía en hielo seco. Los componentes del kit deben llegar congelados, excepto Multi Taq 2 DNA Polymerase, que se almacena en un tampón que evita la congelación del reactivo.

Compruebe que el kit esté completo cuando lo reciba. No utilice kits que se hayan descongelado a la llegada. Si uno o más componentes no están congelados, o si los tubos o el embalaje se han deteriorado durante el envío, no se puede garantizar el rendimiento.

Guarde todos los componentes entre -25 °C y -15 °C, protegidos de la luz. Especialmente el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Primer Mix, DNA Size Standard 550 (BTO) y Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder deben almacenarse protegido de la luz.

Para evitar la contaminación, recomendamos que los componentes de preamplificación (muestras de RNA cDNA, el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control) y los componentes posteriores a la amplificación (DNA Size Standard 550 (BTO) y Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder) se almacenan y utilizan por separado de los reactivos de PCR (Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A y Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Primer Mix).

El kit caducará según la información que figura en la etiqueta de la caja del kit o 24 meses después de su apertura, lo que ocurra primero. No exceda un máximo de 20 ciclos de congelación-descongelación.

## Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados

### Equipo general de laboratorio

- Centrífuga de sobremesa con rotor para tubos de reacción de 2 mL y 200 µL
- Centrífuga con rotor para placas microtiter para placas de reacción de 96 pocillos
- Mezclador vórtex
- Pipetas calibradas ajustables con puntas filtrantes desechables, herméticas a los aerosoles
- Placas de reacción de 96 pocillos de 200 µL o tubos de reacción de 200 µL apropiados con el material de cierre correspondiente, de grado PCR
- Gradillas adecuadas para tubos de reacción de 2 mL y 200 µL
- Rejilla de enfriamiento adecuada para tubos de 2 mL.
- Guantes desechables sin polvo
- NanoDrop™ One Spectrophotometer o Qubit™ Fluorometer

#### NOTA



Todo el material utilizado para PCR deberán tener la calidad adecuada (sin DNA y para biología molecular). Asegúrese de que todos los instrumentos utilizados se han instalado, calibrado, comprobado y mantenido de acuerdo con las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

### Reactivos, kits y consumibles

#### Tabla 3 Reactivos necesarios, pero no suministrados

Tenga en cuenta que algunos reactivos y consumibles se utilizan en combinaciones específicas y no todos son necesarios para cada ciclo.

Reactivo	Proveedor	Número de pedido
Matrix Standard BT5 multi (25 µL)	BIOTYPE GmbH	45-15100-0025
Matrix Standard BT5 multi (2 x 25 µL)	BIOTYPE GmbH	45-15100-0050

Reactivo	Proveedor	Número de pedido
RNeasy Mini Kit,	Qiagen GmbH	74104
RNeasy Midi Kit	Qiagen GmbH	75144
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen GmbH	74134
NucleoSpin Dx RNA Blood (50 preparations)	Macherey-Nagel	740201.50
Maxwell® CSC RNA Blood Kit (48 preparations)	Promega	AS1410
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

## Instrumentos y software

Además de los métodos manuales de extracción basados en columnas descritos en el capítulo Preparación de muestras, La siguiente automatización se puede utilizar para la extracción de RNA:

- Dispositivo Maxwell® CSC (cat. n.º: AS6000, Promega)

El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit Se ha validado su uso con los siguientes cicladores de PCR:

- ProFlex PCR System (cat. n.º: 4484073 (Bloque de muestras de 3 x 32 pocillos), 4484075 (Bloque de muestras de 96 pocillos); Thermo Fisher Scientific)
- GeneAmp® PCR System 9700 Silver (descatalogado, Thermo Fisher Scientific)
- Mastercycler nexus gradient (cat. n.º: 6331000017, Eppendorf AG)
- Mastercycler ep-S (descatalogado, Eppendorf AG)
  
- Biometra Tadvanced (cat. n.º: 846-2-070-211; Analytik Jena)

La aplicación de cicladores de PCR distintos de los anteriormente indicados debe ser validada por el usuario. Se deben cumplir las siguientes especificaciones:

- Tapa calefactable
- Bloque adecuado para placas/tubos de reacción de 200 µL.
- Rampa ajustable a 4 °C/s

El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit se ha validado su uso con el siguiente instrumento y los siguientes ajustes:

- Versión del software 4.0.1 Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific),
  - POP-4™ Polymer para 3500/3500xL Genetic Analyzer
  - POP-7™ Polymer para 3500/3500xL Genetic Analyzer
  - 3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 36 cm
  - 3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 50 cm
- Versión del software 1.2.4 SeqStudio™ Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific),

El análisis de los datos se realizó con el software:

- GeneMapper™ ID-X software, versión 1.6 (Thermo Fisher Scientific), utilizando productos específicos (ver también [Tabla 11](#)):
  - Analysis Method: AMLplexIVD\_Analysis1\_v1x o AMLplexIVD\_Analysis4\_v1x o AMLplexIVD\_Analysis7\_v1x
  - Bin: AMLplexIVD\_Bins1\_v1x o AMLplexIVD\_Bins4\_v1x o AMLplexIVD\_Bins7\_v1x
  - Panel: AMLplexIVD\_Panel1\_v1x o AMLplexIVD\_Panel4\_v1x o AMLplexIVD\_Panel7\_v1x
  - Size Standard: BTO\_60-550\_v1x

No se validará ninguna evaluación manual de los archivos fsa ni ningún resultado obtenido con el software de recopilación de datos sin el software descrito para el análisis y la evaluación de los datos.

#### NOTA



Asegúrese de que todos los instrumentos utilizados se hayan instalado, calibrado, comprobado y mantenido de acuerdo con las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

## Muestras y muestras de ensayo

Las siguientes muestras han sido validadas con el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit:

- Muestras de sangre venosa periférica humana (EDTA, citrato, heparina y estabilizador RNA Exact), almacenado a 4 °C y procesado para la purificación de RNA en 24 horas.
- Muestras de médula ósea (EDTA, heparina), almacenado a 4 °C y procesado para la purificación de RNA en 24 horas.

El RNA obtenido se conservará sin diluir a una temperatura comprendida entre -85 °C y -70 °C.

#### NOTA



Asegúrese de que el anticoagulante utilizado para la extracción de sangre sea compatible con el kit de aislamiento de RNA de las instrucciones del fabricante.

## Advertencias y precauciones

- Lea atentamente las instrucciones de uso antes de utilizar el producto.
- Lea las fichas de datos de seguridad (SDS) y declaraciones sobre la ausencia de peligros (NHS) para todos los productos BIOTYPE, que están disponibles previa solicitud o a través de ([www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter](http://www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter)). Para productos que no requieren una SDS ya que no contienen un SVHC o están sujetos a

otras restricciones del Reglamento 1272/2008. (CLP), BIOTYPE proporciona la SDS previa solicitud.

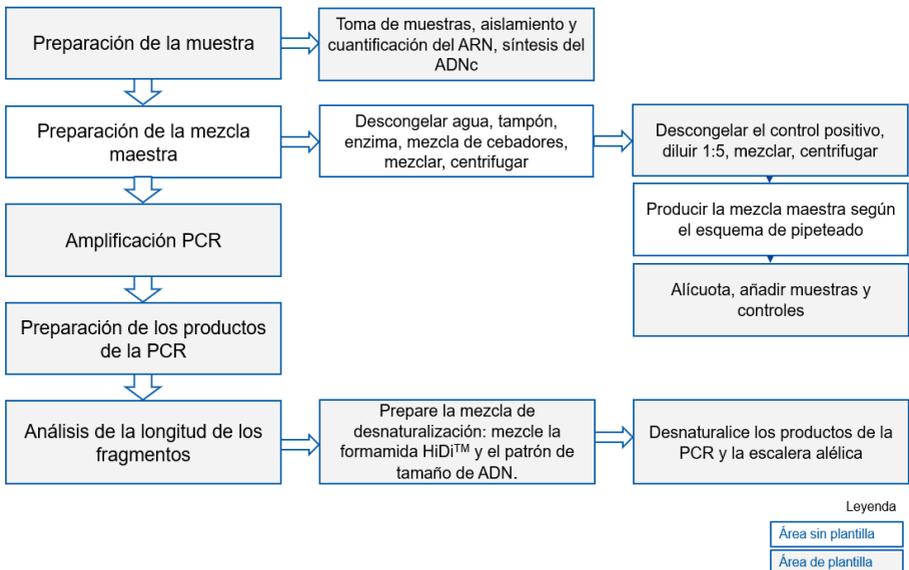
- Póngase en contacto con los fabricantes de los materiales y reactivos necesarios, pero no proporcionados, para obtener copias de la SDS para cualquier reactivo adicional que sea necesario.
- No se deben mezclar los componentes de diferentes lotes del kit.
- No está permitido alicuotar los componentes del kit en otros recipientes de reacción.
- El uso de este producto está limitado a usuarios profesionales de laboratorio, formados en técnicas de genética molecular PCR multiplex, y el manejo de Genetic Analyzers de Thermo Fisher Scientific.
- Antes del primer uso, compruebe los siguientes aspectos del producto y de los componentes:
  - Integridad
  - Integridad en cuanto a número, tipo y llenado (véase el capítulo Materiales proporcionados)
  - Etiquetado correcto
  - Congelación al llegar (excepto la Multi Taq 2 DNA Polymerase)
- Las muestras deben tratarse siempre como infecciosas y/o biopeligrosas, de acuerdo con los procedimientos de seguridad del laboratorio.
- No utilice un kit que haya caducado.
- Deseche la muestra y los residuos del ensayo de acuerdo con las normas locales de seguridad y eliminación de residuos.
- Todos los instrumentos utilizados han sido instalados, calibrados, comprobados y mantenidos de acuerdo con las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

## Aviso al usuario

Cualquier problema que surja en relación con el producto deberá comunicarse al fabricante por parte del usuario. Cualquier incidente grave relacionado con este kit debe comunicarse al fabricante y a la autoridad competente de los Estados miembros en los que esté establecido el usuario o el paciente. Un resumen de seguridad y rendimiento (SSP) se crea de conformidad con el artículo 29 del Reglamento (EU) 2017/746 y destinado a proporcionar acceso público a través de la base de datos EUDAMED a un resumen actualizado de los datos sobre la seguridad y el rendimiento del dispositivo para los usuarios previstos, en el caso de este producto, únicamente profesionales de laboratorio.

## Procedimiento

### Resumen del flujo de trabajo experimental



## Preparación de muestras

### Requisitos de las muestras sin tratar

La muestra para el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit se define como cDNA transcrito de RNA extraído de sangre venosa periférica completa o médula ósea recogida de seres humanos.

Recomendamos el uso de reactivos para la estabilización de RNA durante la recolección de muestras. Los estabilizadores de RNA ayudan a preservar la integridad del RNA (por ejemplo S-Monovette RNA Exact). El aislamiento del RNA debe realizarse inmediatamente después de la recogida de la muestra.

#### NOTA



Un almacenamiento prolongado del material de muestra sin procesar puede provocar la fragmentación del material genético y, por lo tanto, una calidad insuficiente del material. Esto puede empeorar el resultado del análisis, por ejemplo, debido a una disminución de las señales o a controles internos no válidos.

### Sangre

Tome al menos una muestra de 200 µL de sangre venosa periférica completa para el siguiente procedimiento.

El manejo de la sangre total venosa periférica debe seguir las recomendaciones de la guideline MM05–A2 (2<sup>nd</sup> edition), del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) donde se afirma que la sangre completa puede almacenarse a temperatura ambiente (entre 22 °C y 25 °C) durante un máximo de 24 horas, o entre 2 °C y 6 °C durante 72 horas o más. Además, se recomienda que los anticoagulantes utilizados para la extracción de sangre total sean EDTA, citrato o heparina.

### Médula ósea

Tome al menos una muestra de 200 µL de médula ósea para el siguiente procedimiento.

El manejo de los aspirados de médula ósea debe seguir las recomendaciones de la CLSI guideline MM05–A2 (2<sup>nd</sup> edition), donde se establece que los aspirados de médula ósea anticoagulada (EDTA o citrato) debe conservarse y transportarse a 4 °C. El RNA para obtener los mejores resultados, debe extraerse entre 1 y 4 horas después del muestreo.

### Extracción de RNA

Lleve a cabo la extracción y purificación de RNA de sangre periférica completa (PB) o aspirados de médula ósea (BM) con uno de los siguientes kits:

- RNeasy® Midi/ Mini/ Plus Mini Kit (Qiagen GmbH) para anticoagulantes EDTA, citrato y heparina en BM y PB
- NucleoSpin® Dx RNA Blood (Macherey-Nagel) para estabilizador RNA Exact en la sangre periférica
- Maxwell® CSC RNA Blood Kit (Promega) para anticoagulantes EDTA y heparina en la médula ósea

Siga los manuales y recomendaciones del fabricante para la extracción de RNA. Se recomienda realizar una **digestión** de **DNase** durante el aislamiento, según las instrucciones del fabricante.

#### NOTA



La contaminación sanguínea se puede detectar visualmente en la reacción de PCR o en el RNA aislado por un cambio de color a naranja. Si se observa un cambio de color, recomendamos repetir el aislamiento de RNA para evitar cualquier posible interferencia

#### NOTA



Asegúrese de eliminar cualquier rastro de etanol antes de la elución del ácido nucleico. El etanol es un potente inhibidor de PCR.

## Cuantificación y dilución de RNA

Cuantifique la concentración de RNA mediante espectroscopia UV/VIS a 260 nm utilizando el NanoDrop™ One spectrophotometer o mediante espectroscopia de fluorescencia utilizando el Qubit™ Fluorometer.

Cuando utilice espectrofotometría, utilice el tampón de elución del kit de extracción de RNA para medir el espacio en blanco. La relación A260/A280 deberá estar comprendida entre 1,9 y 2,1, mientras que la relación A260/A230 deberá estar comprendida entre 1,8 y 2,3.

Para la cuantificación fluorométrica del RNA se puede usar el Qubit™ Fluorometer con el Qubit™ RNA HS Assay-Kit o Qubit™ RNA BR Assay-Kit .

Para usar con Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit, diluya las muestras de RNA a una concentración adecuada para la posterior transcripción en cDNA. Prepare la dilución justo antes de su uso. Utilice agua libre de nucleasas como diluyente.

### NOTA



El rango de entrada para la transcripción en cDNA sigue las instrucciones del fabricante del kit de transcripción. Los usos de 100 ng - 1 µg de RNA en un volumen de reacción final de 20 µL para la síntesis de cDNA están validados para ambos tipos de muestras. Recomendamos utilizar una cantidad óptima de **500 ng para la médula ósea y 1 µg para la sangre periférica.**

## Almacenamiento de RNA

Guarde las muestras sin diluir de RNA en agua libre de RNA sa entre -25 °C y -15 °C hasta 24 horas o entre -85 °C y -70 °C hasta un año.

## Transcripción en cDNA

Realice la síntesis del ADNc según las instrucciones del fabricante, utilizando uno de los siguientes kits:

- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific)

- SuperScript IV First Strand cDNA Synthesis System\* (Thermo Fisher Scientific)

\*recomendado para cantidades reducidas de RNA

#### NOTA



La inactivación por calor de la transcriptasa inversa es crucial para el rendimiento de la PCR. Consulte las instrucciones del fabricante para obtener más información.

### Almacenamiento de cDNA

Almacene las muestras de cDNA entre -25 °C y -15 °C durante un máximo de un año.

### Preparación del control

#### Control positivo (PC)

Descongele el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control, homogeneícelo agitando cuidadosamente con un vórtex y centrifugándolo brevemente.

Diluya el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control 1:5 usando el Nuclease-Free Water incluida en el kit. Por ejemplo, mezclar 1 µL del control con 4 µL de Nuclease-Free Water.

Homogeneice el PC diluido agitando con cuidado en un vórtex. A continuación, centrifugar brevemente el PC diluido (aprox. 5 s).

No guarde el control positivo diluido.

#### NOTA



Aplique siempre una dilución nueva del Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control

#### Control sin plantilla (NTC)

Aplique el agua sin nucleasas incluida en el kit como control sin plantilla NTC en lugar de una muestra.

## Configuración de la mezcla maestra

Retire y descongele los siguientes componentes del Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit:

- Nuclease-Free Water (tapón azul claro)
- Reaction Mix A (tapón morado)
- Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Primer Mix (tapón rojo)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (tapón blanco)

Todos los componentes congelados deben descongelarse a temperatura ambiente (entre 22 °C y 25 °C, durante aproximadamente 30 minutos, protegidos de la luz) y homogeneizarse invirtiendo los tubos, pipeteando o agitando suavemente con un vórtex. A continuación, centrifugar brevemente los reactivos (aprox. 5 s). Antes de preparar la mezcla maestra, se recomienda mantener la Multi Taq 2 DNA Polymerase en un entorno refrigerado durante el mayor tiempo posible (por ejemplo, en una rejilla de enfriamiento).

### NOTA



Mezcle la Multi Taq 2 DNA Polymerase agitando suavemente para lograr una mayor estabilidad; **no agite en la enzima.**

Prepare la mezcla maestra de PCR según la [Tabla 4](#) en un tubo de microcentrífuga del tamaño adecuado para el número total de muestras que se vayan a analizar, en una zona limpia y exclusiva. Incluya al menos un PC y un NTC en su cálculo.

### NOTA



Como regla general, si se analizan menos de 10 muestras, utilice suficiente mezcla maestra para una muestra adicional. Si está analizando 10 muestras o más, utilice un volumen de mezcla maestra de reactivo adicional del +10 %.

**Tabla 4 Preparación de la mezcla maestra para la reacción PCR**

Componente	Volumen		
	# 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 <sup>QS</sup> 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 plantilla o muestra de control*	1,0 µL	5 x 1,0 µL	10 x 1,0 µL
<b>Volumen total</b>	<b>25,0 µL</b>	<b>125,0 µL</b>	<b>250,0 µL</b>

\*La entrada de la plantilla se puede aumentar a 2 µL, para ello se debe ajustar el volumen de agua libre de nucleasas.

Mezcle la mezcla maestra agitando suavemente y, a continuación, centrifugue brevemente.

Dispense 24,0 µL de la mezcla maestra de PCR en tubos preparados de 200 µL de PCR y centrifugue brevemente los tubos cerrados.

### Aplicación de las plantillas y controles de cDNA

Añada 1,0 µL de los siguientes tipos de muestra a los tubos de PCR preparados con la mezcla maestra de PCR.

**NTC:** añada 1,0 µL de Nuclease-Free Water en lugar de una muestra.

**plantilla cDNA:** añada 1,0 µL de las muestras diluidas de cDNA.

**PC:** Añada 1,0 µL delMentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control recién preparado en lugar de una muestra.

### NOTA



Primero, prepare el NTC para evitar contaminaciones del control. Prepare el PC como último paso para evitar la contaminación cruzada de las muestras.

**NOTA**

Utilice al menos un control positivo PC y un control sin plantilla NTC por ciclo. De lo contrario, el ciclo no se podrá validar.

Cierre todos los tubos de PCR, agite suavemente y centrifugue.

**Amplificación de PCR**

Programa el ciclador de PCR con el siguiente perfil de amplificación, asegúrese de ajustar la rampa a 4 °C/s. Realice una PCR de «arranque en caliente» para activar la polimerasa y evitar la formación de productos de amplificación no específicos.

**NOTA**

Utilizando cicladores calibrados y bien mantenidos de PCR es esencial, ya que las desviaciones pueden afectar negativamente a la amplificación de objetivos sensibles, como KMT2A::MLLT4.

**Tabla 5 Protocolo de PCR**

Temperatura	Tiempo	
96 °C	4 min (inicio en caliente para activar la polimerasa)	
96 °C	30 s	
60 °C	120 s	25 ciclos
72 °C	75 s	
68 °C	10 min*	
10 °C	∞	mantener

\* Si se observa una mayor cantidad de picos de adenina negativa (-1 pb), es posible prolongar hasta 60 minutos.

**NOTA**



Si se utilizan termocicladores con velocidades de calentamiento y enfriamiento ajustables, **la rampa se ajustará a 4 °C/s** para proporcionar un equilibrio óptimo del kit.

**NOTA**



Para obtener información básica sobre la configuración, programación y mantenimiento de los diferentes instrumentos de PCR, consulte el manual del usuario del instrumento correspondiente.

## Electroforesis capilar en gel

### Preparación de los productos de PCR

Una vez completada la PCR, retire las muestras del cicladora y centrifugarlas brevemente.

**NOTA**



Una vez completada la PCR, los productos de PCR se pueden conservar durante 4 semanas a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C, o durante más tiempo a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C, protegido de la luz.

Descongele, mezcle y centrifugue los reactivos:

- Hi-Di™ Formamide (no incluido en el kit)
- Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder (tapón verde)
- DNA Size Standard BTO (550) (tapón naranja)

Prepare la mezcla de desnaturalización descrita en la [Tabla 6](#) y añada una o dos reacciones para compensar las variaciones en el pipeteo. Incluya una reacción adicional para la escalera alélica.

**Tabla 6 Mezcla de desnaturalización**

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

Pipetee 12,0 µL de la mezcla de desnaturalización en los pocillos de una placa de PCR (apto para su uso en el Genetic Analyzer).

Añada 1,0 µL de producto de PCR o 1.0 µL de Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder en los pocillos. Selle la placa de PCR con una lámina adecuada, agite en vórtex y centrifugue la placa brevemente.

**NOTA**

La escalera alélica se utiliza para determinar correctamente los fragmentos analizados durante el análisis de datos. En cada análisis de longitud de fragmentos, la escalera alélica debe analizarse al menos una vez para garantizar el éxito del análisis de datos.

**NOTA**

Los capilares del dispositivo de electroforesis en gel nunca deben quedarse secos. Si las muestras no ocupan todas las posiciones capilares, llene los pocillos adicionales de la placa con 12,0 µL. Hi-Di™ Formamide según el número capilar.

Desnaturalice los productos preparados de PCR en un ciclador de PCR durante 3 minutos a 95 °C y, a continuación, enfríe las muestras a 4 °C en el ciclador. Centrifugue las muestras brevemente antes de analizar la longitud de los fragmentos.

## Análisis de la longitud de los fragmentos

Antes de realizar el primer análisis de longitud de fragmentos, ejecute el **Matrix Standard BT5 multi** (BIOTYPE GmbH) realizar una alineación

espectral de los colorantes fluorescentes utilizados para Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit (6-FAM™, BTG, BTY, BTO).

**NOTA**



Consulte las instrucciones de uso de Matrix Standard BT5 multi para su instalación. Están disponibles en [www.biotype.de/en/ifus](http://www.biotype.de/en/ifus) o previa solicitud a través de [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de) por BIOTYPE GmbH.

Una vez que se ha ejecutado correctamente el Matrix Standard BT5 multi, importe la configuración del instrumento proporcionada para 3500 Genetic Analyzer tal y como se describe en la Table 7 ([www.biotype.de/en/template-files](http://www.biotype.de/en/template-files)).

**Table 7 archivos proporcionados para Genetic Analyzers** ([www.biotype.de/en/template-files](http://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

Las especificaciones para el protocolo del instrumento requerido se describen en la Tabla 8. Solo se deben ajustar los parámetros descritos; los demás parámetros deben permanecer en la configuración predeterminada. Siga las instrucciones de uso del fabricante para configurar los parámetros de funcionamiento específicos.

**Tabla 8 Parámetros para los módulos de ejecución de los diferentes dispositivos de electroforesis capilar en gel**

	Injections Voltage [kV]	Injection Time [s]	Run Voltage [kV]	Run Time [s]
3500 Series Genetic Analyzer	3,0	8	36 cm Capillary Array: <b>15</b> 50 cm Capillary Array: <b>19.5</b>	1560
SeqStudio™ Genetic Analyzer	1,2	10	9	1560

A diferencia de los valores indicados en la Tabla 8, el tiempo de ejecución se puede ajustar para garantizar que se analizan todos los fragmentos (60 - 550 pb) de DNA Size Standard 550 (BTO).

Para configurar un Size Standard protocol los siguientes tamaños para DNA Size Standard 550 (BTO) deben asignarse al panel naranja:

**60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525, y 550 bp.**

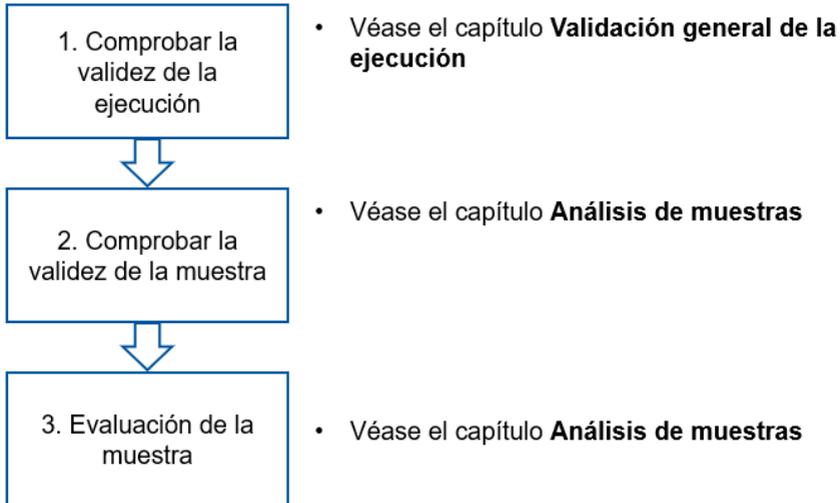
#### NOTA



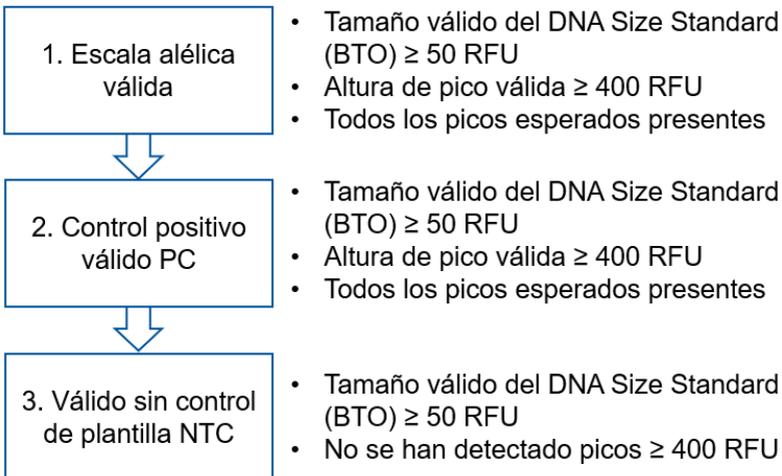
BIOTYPE GmbH proporciona plantillas específicas para la fácil instalación de ajustes de ejecución específicos para el análisis de la longitud de los fragmentos, así como plantillas de análisis para una configuración sencilla del software de GeneMapper™ ID-X. Estas plantillas están disponibles para su descarga a través de: [www.biotype.de/en/template-files](http://www.biotype.de/en/template-files).

## Análisis de datos

### Procedimiento general para el análisis de datos



### Validación general de la ejecución



**NOTA**

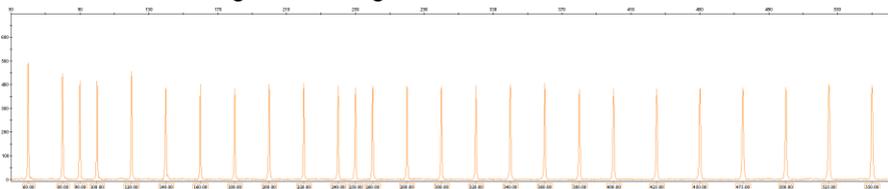
Para evaluar la validez, se debe analizar todo el rango de medición, desde 50 pb hasta 560 pb.

**DNA Size Standard 550 (BTO)**

Encontrar las longitudes exactas de los productos amplificados depende del tipo de dispositivo, las condiciones de electroforesis y el tamaño estándar de DNA usado. Debido a la complejidad de algunos objetivos, la determinación del tamaño debe basarse en referencias distribuidas uniformemente.

Compruebe el DNA Size Standard 550 (BTO) en todas las muestras según los siguientes criterios:

- Presencia de todos los fragmentos en: **60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525, y 550 bp** (véase la [Figura 1](#))
- Todos los fragmentos están presentes con  $\geq 50$  RFU
- Coeficiente de determinación  $R^2 > 0.995$  (véase Size Match Editor de GeneMapper™ ID-X)
- Los fragmentos no disminuyen continuamente en altura máxima al aumentar la longitud del fragmento.



**Figura 1 Electroferograma de los fragmentos de DNA Size Standard 550 (BTO), con longitudes en pb**

**Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder**

Después de asegurarse de que el estándar de tamaño es válido, compruebe que todos los picos de la escalera alélica están presentes con  $\geq 400$  RFU.

**NOTA**

La Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder incluye un pico por cada objetivo detectable. Compare los alelos con el apéndice [Figura 2](#).

**Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control (PC)**

Después de garantizar un estándar de tamaño válido, asegúrese de que todos los picos específicos para el PC están presentes con  $\geq 400$  RFU.

El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control, que forma parte del kit de prueba, representa los siguientes objetivos (véase la [Tabla 9](#)).

**Tabla 9 Picos de control en Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control**

Panel	Pico de control
Azul	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ QS-Control</li> <li>▪ BCR::ABL_b2a3</li> <li>▪ RUNX1::RUNX1T1</li> <li>▪ ABL-Control</li> </ul>
Verde	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ KMT2A-PTD_e11e3</li> </ul>
Amarillo	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ PML::RARA_bcr3</li> </ul>

**NOTA**

El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control incluye al menos un pico por cada panel utilizado. Compare los alelos con el apéndice [Figura 3](#).

**No template control NTC**

Después de asegurarse de que el tamaño es el adecuado, compruebe que no haya picos  $\geq 400$  RFU en el NTC (véase también el apéndice [Figura 4](#)).

**NOTA**



Usando GeneMapper ID-X junto con los archivos de plantilla proporcionados para el método de análisis, los picos < 400 RFU en muestras de Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit no se asignan automáticamente con el nombre del alelo, lo que le ayuda a evaluar fácilmente el NTC.

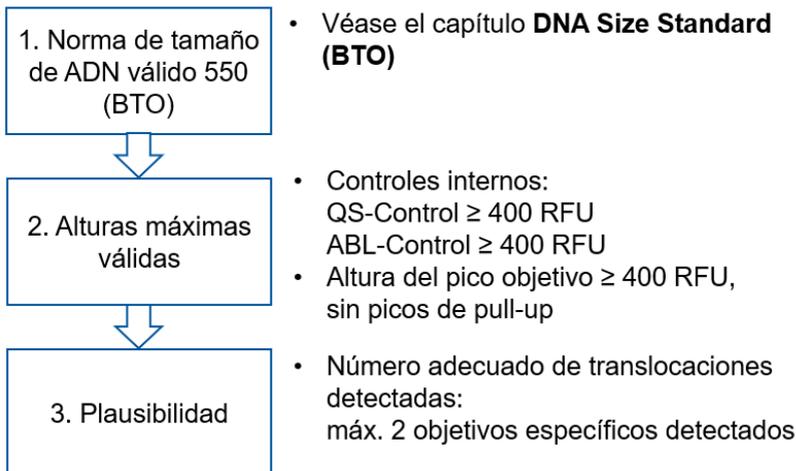
**NOTA**



Pueden aparecer artefactos como pequeñas manchas de tinte de forma más prominente dentro del NTC. Debido a la amplia base del pico, la forma anómala del pico y la ausencia de asignación de picos, es posible diferenciarlos de los picos de amplicones.

## Análisis de muestras

### Análisis de datos del flujo de trabajo



**NOTA**



Si las detecciones de múltiples objetivos superan el límite o si tiene alguna duda, consulte la sección de resolución de problemas (por ejemplo, para obtener una lista de combinaciones de señales conocidas) o póngase en contacto con el servicio de atención al cliente en [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de).

Usando GeneMapper™ ID-X software junto con las plantillas específicas proporcionadas por BIOTYPE GmbH, la validación básica se realiza automáticamente.

Después de comprobar la validez de la ejecución y la muestra, se deben evaluar los datos de la muestra.

**NOTA**



El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> es una **prueba exclusivamente cualitativa**.

Esta aplicación no es adecuada para cuantificar el número de copias ni monitorizar la enfermedad residual mínima (MRD).

Al utilizar las plantillas de evaluación de BIOTYPE GmbH y la evaluación satisfactoria de la escalera alélica de la carrera, los fragmentos de PCR detectados se nombran automáticamente. Un resumen de las longitudes de los fragmentos de los productos de PCR se puede encontrar en la siguiente Tabla 10.

**Tabla 10 Resumen de las longitudes de los fragmentos de las translocaciones en la Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder en el polímero POP-4™.** ‡ Dos amplicones para la variante KMT2A::MLLT3\_6A; \* Aunque esta variante es detectable con Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit, la longitud variable del amplicón (aproximadamente 173 pb) impide la asignación automática.

Panel/ Translocación	Length [bp]	Panel/Translocación	Length [bp]
<b>FAM Panel (Canal azul)</b>		<b>BTG Panel (Canal verde)</b>	
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	<b>BTY Panel (Canal amarillo)</b>	
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		

Panel/ Translocación	Length [bp]	Panel/Translocación	Length [bp]
CBFB::MYH11_TypeB	485		
ABL-Control	519		

## Análisis de datos con GeneMapper™ ID-X

### Preparación de GeneMapper™ ID-X software

Para obtener instrucciones generales sobre la aplicación y el análisis de muestras con este software, consulte el manual del usuario de GeneMapper™ ID-X Software.

La asignación de alelos se llevará a cabo con el software de análisis GeneMapper™ ID-X en combinación con los archivos de plantilla de Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit de BIOTYPE GmbH. Los archivos de plantilla de BIOTYPE (véase la [Tabla 11](#)) están disponibles en nuestra página web ([www.biotype.de/en/template-files](http://www.biotype.de/en/template-files)) como descarga o previa solicitud a través de [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de). El flujo de trabajo del análisis utilizando el GeneMapper™ ID-X software se muestra en la [Tabla 12](#).

**Tabla 11 Plantillas de BIOTYPE GmbH para GeneMapper™ ID-X Software**, plantillas específicas para <sup>1</sup>POP-1™, <sup>2</sup>POP-4™ and <sup>3</sup>POP-7™ polymer

Plantilla	Nombre de la plantilla	
Panels*	AMLplexIVD_Panel1_v1x <sup>1</sup> AMLplexIVD_Panel4_v1x <sup>2</sup> AMLplexIVD_Panel7_v1x <sup>3</sup>	o versiones superiores
BinSets*	AMLplexIVD_Bins1_v1x <sup>1</sup> AMLplexIVD_Bins4_v1x <sup>2</sup> AMLplexIVD_Bins7_v1x <sup>3</sup>	o versiones superiores
Size Standard*	BTO_60-550_v1x	o versiones superiores
Analysis Method*	AMLplexIVD_Analysis1_v1x <sup>1</sup> AMLplexIVD_Analysis4_v1x <sup>2</sup> AMLplexIVD_Analysis7_v1x <sup>3</sup>	o versiones superiores

Plantilla	Nombre de la plantilla
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes
Table Settings	Table for 2 Alleles
	Table for 10 Alleles

\*Estas plantillas deben utilizarse siempre para el análisis de datos. Los demás archivos de plantilla son opcionales.

**NOTA**



La importación y la identificación de alelos con los archivos de plantilla proporcionados solo se garantizan si se usa el GeneMapper™ ID-X software. Cuando se aplica el GeneMapper™ software, es posible que tenga problemas para importar algunos archivos de plantilla. Es posible que tenga que ajustar Panels y Bins con una o más series de la escalera alélica en la configuración específica de su instrumento. Contáctenos para obtener ayuda ([support@biotyper.de](mailto:support@biotyper.de)).

**Tabla 12 Flujo de trabajo de análisis de datos con GeneMapper™ ID-X**

No	Icono	Paso de trabajo
1		Preparación del software
		<b>Panel Manager</b> Importe los archivos de plantilla proporcionados para Panels y Bins
		<b>GeneMapper™ ID-X Manager</b> Importe la plantilla proporcionada para Analysis Method y Size Standard
2		Importación de muestra
		<b>Add Samples to Project</b> - busque la carpeta de ejecución, selecciónela y <b>Add to List</b> → <b>Add</b>
3		Análisis de muestras

No	Icono	Paso de trabajo										
		<p>Seleccione las siguientes propiedades en las columnas correspondientes de la hoja de muestra y elija <b>Analyze</b>.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Nombre de columna</th> <th>Selección</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sample Type</td> <td>Escalera alélica, control positivo, control negativo o muestra</td> </tr> <tr> <td>Analysis Method</td> <td>Seleccione la plantilla AMLplexIVD_Analysis_v1x de BIOTYPE importada previamente</td> </tr> <tr> <td>Panel</td> <td>Seleccione BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x</td> </tr> <tr> <td>Size Standard</td> <td>Seleccione BIOTYPE template BTO_60-550_v1x</td> </tr> </tbody> </table>	Nombre de columna	Selección	Sample Type	Escalera alélica, control positivo, control negativo o muestra	Analysis Method	Seleccione la plantilla AMLplexIVD_Analysis_v1x de BIOTYPE importada previamente	Panel	Seleccione BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x	Size Standard	Seleccione BIOTYPE template BTO_60-550_v1x
Nombre de columna	Selección											
Sample Type	Escalera alélica, control positivo, control negativo o muestra											
Analysis Method	Seleccione la plantilla AMLplexIVD_Analysis_v1x de BIOTYPE importada previamente											
Panel	Seleccione BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x											
Size Standard	Seleccione BIOTYPE template BTO_60-550_v1x											
4	 	<p>4 Compruebe los controles</p> <p>Compruebe la validez del control (escalera alélica, control positivo, control negativo) Con alturas de pico suficientes, la asignación se lleva a cabo según las especificaciones del Analysis Method</p>										
5	 	<p>5 Evaluación de muestras</p> <p>Comprobar la validez de la muestra Con alturas de pico suficientes, la asignación se lleva a cabo según las especificaciones del Analysis Method</p>										

**NOTA**

**i**

Utilizando los archivos de plantilla proporcionados para el Analysis Method, Bins, Panels, y seleccionando el tipo de muestra correspondiente, el software comprueba automáticamente la validez de estas muestras. Las banderas de control de calidad SOS (Sample off-Scale), SQ (Sizing Quality), OMR (Outside Marker Range) serán casillas verdes para indicar que la validez es correcta.

ARNM	SOS	SQ	SSPK	MIX	OMR	CGQ
						

## NOTA



Use el Size Match Editor en GeneMapper™ ID-X evaluar el estándar de tamaño. Si falla la identificación automática de fragmentos, se pueden utilizar los tripletes 80 / 90 / 100 pb y 240 / 250 / 260 pb como orientación para la asignación manual de picos.

## Solución de problemas

Para una detección precisa y fiable de los objetivos, análisis post-PCR, incluida la asignación y validación automáticas de objetivos, debe realizarse utilizando el GeneMapper™ ID-X software validado en combinación con los archivos de plantilla de BIOTYPE. En caso de duda, póngase en contacto con [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de).

### Picos de pequeña intensidad

Pueden producirse picos de pequeña intensidad si las alturas de los picos se encuentran fuera del rango de detección lineal o si se ha aplicado una matriz incorrecta. Aparecen en posiciones de picos específicos en otros canales de color, normalmente con intensidades de señal más bajas.. Este efecto debe tenerse en cuenta en casos de perfiles de amplificación elevados de los siguientes objetivos:

- PML::RARA\_bcr3 (canal amarillo) provoca un pico de pequeña intensidad en KMT2A::ELL\_e10e2 (canal verde)
- RUNX1::RUNX1T1 (canal azul) provoca un pico de pequeña intensidad en KMT2A::MLLT4 (canal verde, solo si se usó POP-7™ Polymer )

### Adición de nucleótidos independiente de la plantilla

Debido a su actividad transferasa terminal, la Multi Taq 2 DNA Polymerase tiende a añadir un radical adenosina en el extremo 3' de los fragmentos de DNA amplificados. El pico del artefacto es una base más corto de lo esperado (picos de -1 pb). Todos los cebadores BIOTYPE están diseñados para minimizar estos artefactos. La formación de artefactos se reduce aún más mediante la prolongación opcional del paso de extensión final del

protocolo de PCR a 68 °C durante 60 min. La altura del pico del artefacto se correlaciona con la cantidad de cDNA. Los laboratorios deben definir sus propios límites para el análisis de los picos.

### **Artefactos**

La temperatura ambiente puede influir en el rendimiento de los productos de PCR en instrumentos multicapilares; y se producen picos en los hombros o picos divididos. Además, en algunos casos, la asignación automática podría verse influida. Si se producen estos efectos, recomendamos inyectar la muestra de nuevo a una temperatura ambiente más alta. Considere siempre el uso de consumibles nuevos según las recomendaciones del fabricante.

### **Influencia de los polímeros**

El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit fue validado y certificado para el análisis en POP-4™ polymer. El uso de otros polímeros (como POP-7™ o POP-1™) ha sido verificado, pero podría influir en el comportamiento de ejecución de productos específicos de PCR. Además, el ruido de fondo podría aumentar debido al comportamiento diferente de los colorantes fluorescentes libres.

### **Desviaciones en el pipeteo**

El análisis de solidez del Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit demostró que el kit es resistente a desviaciones menores del protocolo descrito (desviación de +/- 10 %). Una desviación media (+/- 20 %) del protocolo experimental descrito puede ser más crítica para el análisis. Es fundamental prestar atención a las desviaciones medias del -20 % en componentes de PCR, ya que reducen significativamente la altura de la señal. Los objetivos más sensibles en este contexto son KMT2A::MLL4 y DEK::NUP214.

Para minimizar cualquier desviación, recomendamos utilizar pipetas calibradas, pipetear con precisión y mezclar bien.

### **Picos bajos de control de ABL**

El control interno ABL forma el amplicón más largo del Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit y, por lo tanto, es un marcador esencial para el control de calidad. En caso de una altura de pico de ABL-control baja, una de las siguientes causas es la más probable:

Entrada de plantilla demasiado baja en la reacción: determine la concentración de RNA e incremente la cantidad de entrada de síntesis de cDNA según sea necesario.

RNA fragmentado, es decir, los amplicones más pequeños de los objetivos pueden dar positivo, pero falta el control interno de ABL. Compruebe el flujo de trabajo de preparación de muestras para ver si hay contaminación de RNA. La fragmentación de RNA se sabe que se produce en muestras archivadas.

Síntesis de cDNA ineficaz: asegurar el cumplimiento de las instrucciones de los fabricantes durante la síntesis de cDNA. Utilice uno de los kits de síntesis de cDNA validados tal y como se describe en el capítulo Transcripción en cDNA.

La muestra está contaminada con la enzima transcriptasa inversa activa: asegúrese de seguir las instrucciones del fabricante, prestando especial atención al paso de inactivación por calor durante la síntesis de cDNA.

### **Amplicones adicionales o dobles positivos**

Se espera que la mayoría de las muestras de pacientes muestren un resultado negativo o positivo para una translocación. Más de una translocación es un resultado inusual y puede requerir una verificación adicional. Sin embargo, se han observado algunas combinaciones en muestras de pacientes, como las siguientes:

El BCR::ABL\_b2a3 objetivo puede aparecer con una altura máxima relativamente baja si hay una fuerte amplificación del ABL-control o cualquier otra variante transcrita de BCR::ABL (aproximadamente entre el 5 % y el 10 % del resultado objetivo principal).

El KMT2A partial tandem domain (KMT2A-PTD) Se sabe que ocurre simultáneamente con otras translocaciones y en reordenamientos complejos que pueden dar positivo para más de una variante de KMT2A-PTD.

Al usar POP7<sup>TM</sup>-Polymer, la translocación CBFβ::MYH11\_Type A podría dar lugar a una señal inespecífica para RUNX1::RUNX1T1 y CBFβ::MYH11\_Type F. El pico RUNX1::RUNX1T1 se asigna como fuera de la escalera cuando se utiliza el polímero POP4<sup>TM</sup> y podría verificarse utilizando la línea celular ME-1. Ambos picos secundarios inespecíficos

muestran una altura de pico RFU inferior en comparación con CBFB::MYH11\_Type A. Al usar POP7™-Polymer un pico no específico fuera de la escala puede asignarse como translocación de CBFB::MYH11\_Type I con alturas máximas inferiores a 2000 RFU.

El KMT2A::MLLT4 objetivo se produce con dos longitudes de amplicón diferentes, dependiendo de la prevalencia específica de las variantes de transcripción en la muestra. La mayoría de las muestras de pacientes muestran ambos amplicones con una diferencia de longitud de tres nucleótidos como un pico doble en el bin KMT2A::MLLT4 objetivo. Este es un resultado válido, no es necesario tomar medidas correctivas.

Cualquier traslocación de KMT2A puede producirse con el punto de ruptura en el exón 9 (más frecuente) o en los exones 10 y 11 (poco frecuente). Cualquier pico fuerte fuera de la escalera en el canal verde puede tener su origen en una traslocación de KMT2A atípica y puede verificarse con otros métodos.

La variante de transcripción KMT2A::MLLT3 objetivo 6A puede producir dos amplicones detectables en caso de una entrada muy alta y una muy alta calidad de RNA, los picos correspondientes son 6A\_S (short, obligatorio) y 6A\_L (long, opcional). Se trata de un fenómeno necesario inherente al diseño del cebador de Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit. Este es un resultado válido, no es necesario tomar medidas correctivas.

Un pico fuera de la escalera en el canal amarillo entre los contenedores de PML::RARA\_bcr1 y \_bcr3 probablemente esté causado por una variante de PML::RARA\_bcr2. Este objetivo tiene varios puntos de ruptura en el exón PML 6 y, por lo tanto, no se pueden asignar a ningún contenedor específico.

## Evaluación del rendimiento

### Sensibilidad analítica

El tipo de muestra del Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit se define como cDNA transcrito a partir de RNA celular aislado de sangre total venosa periférica o aspirado de médula ósea. Para muestras de sangre el RNA en el rango de 50 ng a 1000 ng se puede medir con una altura de pico suficiente del ABL-Control utilizando el cDNA synthesis kits SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) y High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) validados durante esta evaluación de rendimiento. Suponiendo una eficiencia de transcripción del 100 %, esto da como resultado un rango de concentración de cDNA de 2,5 ng/μL a 50 ng/μL; 1 μL de cDNA se usa en la reacción de PCR. Para muestras de médula ósea el RNA en un rango de 50 ng a 1000 ng utilizando el SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) y de 100 ng a 1000 ng utilizando el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) es medible con una altura de pico suficiente del ABL-Control. Suponiendo una eficiencia de transcripción del 100 %, esto da como resultado un rango de concentración de cDNA de 2,5 ng/μL respectivamente, de 5 ng/μL a 50 ng/μL; 1 μL de cDNA se usa en la reacción de PCR. La cantidad de entrada RNA opcional se define como 1000 ng para muestras de sangre periférica completa y 500 ng para muestras de médula ósea. En caso de muestras con una concentración de RNA baja u objetivos críticos, la cantidad de entrada de cDNA en la PCR puede aumentarse hasta 4 μL para cDNA transcrito con el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), independientemente del tipo de muestra. Para el cDNA transcrito con el SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific), la cantidad de entrada de cDNA está limitada a un máximo de 2 μL.

El Limit of Blank (LoB) se probó en 12 muestras con diferente origen de espécimen con la cantidad óptima de entrada definida previamente. Dado que no se detectaron picos inespecíficos por encima del umbral de 400 RFU

de altura máxima en el rango de 55 pb a 550 pb en ninguna de las 12 muestras analizadas, se puede establecer un umbral de 400 RFU.

El Limit of Detection (LoD) del Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit se probó con 6 muestras artificiales de cDNA de fondo, cubriendo todos los pares de cebadores en la mezcla de cebadores con pares de cebadores que detectan más de un objetivo amplificando la variante de transcripción más larga y, por lo tanto, más difícil de detectar.

El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit mostró un límite de detección aceptable según los criterios de aceptación, con un LoD máximo de 400 copias para los objetivos analizados (véase la [Tabla 13](#)), excepto el KMT2A::MLLT4, que aún mostraba un resultado aceptable con un LoD de 1000 copias. Dado que no se pudieron analizar todas las variantes transcripcionales de las fusiones génicas detectables, se considera que un LoD global de 1000 copias, que fue el resultado más alto de los objetivos analizados, es aplicable con seguridad.

**Tabla 13. LoD para el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit.**

Muestra	Objetivo	LoD [copias]
Muestra 1	CBFB::MYH11_TypeJ	200
	BCR::ABL_e1a2	200
	CBFB::MYH11_TypeB	200
	KMT2A-PTD_e11e3	200
	PML::RARA_bcr1	400
Muestra 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
Muestra 3	CBFB::MYH11_TypeG	200
	BCR::ABL_b2a3	100
	CBFB::MYH11_TypeE	200
	KMT2A::ELL_e10e3	100

Muestra	Objetivo	LoD [copias]
Muestra 4	CBFB::MYH11_Type1	200
	MLLT10_240::PICALM_2092	200
	RUNX1::RUNX1T1	400
	DEK::NUP214	200
Muestra 5	KMT2A::MLLT4 (short)	1000
Muestra 6	KMT2A::MLLT4 (short)	500
	KMT2A::MLLT4 (long)	500

Dado que el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit es un ensayo cualitativo diseñado para determinar la presencia o ausencia del analito objetivo, analizar el Limit of Quantitation (LoQ) no se considera relevante para el uso previsto.

## Especificidad analítica

Probamos la identificación automática de alelos con la escalera alélica y la concordancia de la asignación de alelos en comparación con muestras artificiales de los objetivos de translocación utilizando el GeneMapper™ ID-X software. Basándose en los resultados, se determinaron los ajustes específicos del dispositivo para el genotipado mediante electroforesis capilar en gel (bins y panels) del Genetic Analyzer.

Los cebadores de PCR están diseñados para unirse de forma complementaria a la secuencia de ADN de referencia oficial del genoma humano. Las variantes genéticas como Single Nucleotide Polymorphism (SNPs, INDELS o deleciones) pueden afectar a la unión específica de los cebadores y se evaluaron mediante entradas de la dbSNP relevantes para el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit. Una entrada (rs73504425) provoca la pérdida de la función del cebador. El alelo variante se da en el 0,6 % de la población africana y se localiza dentro del sitio de unión del cebador para PICALM::MLLT10, un gen de fusión poco frecuente con una prevalencia inferior al 1 %.

Además, se realizó una búsqueda BLAST en el transcriptoma humano para el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Primer Mix y no produjo productos de amplificación inespecíficos en el rango de 0 a 600 pb.

## Precisión y veracidad

La precisión analítica del Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit se basa en los resultados de los estudios de veracidad del kit. BIOTYPE GmbH participa activamente en un programa External Quality Assessment (EQA) desde 2013. La presencia o ausencia de una translocación en las muestras se determina a partir del consenso de los resultados de todos los participantes en este EQA. Desde 2013 se han analizado un total de 68 muestras.

A partir de estos resultados, se creó una matriz de contingencia basada en la comparación de los resultados del Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit (positivo/negativo) y los resultados reales (positivo/negativo), confirmados por el consenso de todos los participantes del External Quality Assessment program. Según CLSI EP12 (3.ª edición), los parámetros clave de rendimiento que se muestran en la [Tabla 14](#) se calcularon a partir de la matriz de contingencia.

**Tabla 14 Características analíticas del Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit.**

Características analíticas	Estimación	Intervalo de confianza inferior del 95 %	Intervalo de confianza superior del 95 %
Sensibilidad analítica	92,2 %	81,5 %	96,9 %
Especificidad analítica	94,1 %	73,0 %	99,0 %
Valor predictivo positivo	97,9 %	89,1 %	99,6 %
Valor predictivo negativo	80,0 %	58,4 %	91,9 %
Precisión	92,6 %	83,9 %	96,8 %

Estos cálculos proporcionan una medida exhaustiva de la capacidad de Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit de clasificar correctamente los casos positivos y negativos con una probabilidad del 92 % y del 94 %, respectivamente. La proporción global de resultados correctos es del 93 %, lo que demuestra una alta fiabilidad. El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR

Amplification Kit demuestra un alto rendimiento analítico, lo que valida la eficacia y fiabilidad del ensayo.

## **Precisión**

Evaluamos la repetibilidad y reproducibilidad del ensayo basándonos en el ISO 5725-2:2022-05 y el CLSI EP05 (3.ª edición). Cinco muestras artificiales y el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control se evaluaron en un estudio multisitio de 5 x 5 x 3 (día x réplica x sitio). El estudio multisitio examina la principal fuente de variación (repetibilidad y reproducibilidad) debida a los diferentes sitios probados, que presentarán diferentes operadores que realizan mediciones en diferentes sitios utilizando diferentes instrumentos. La repetibilidad resultante osciló entre el 8,3 % CV y el 15,6 % CV, y la reproducibilidad entre el 14,6 % CV y el 30,5 % CV. En general, el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit muestra una precisión aceptable con  $SD_{Rep} \leq 2500$  RFU para todas las fusiones génicas específicas analizadas con las muestras artificiales 1 a 5 y para el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control.

## **Límite de corte del ensayo**

El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit utiliza la detección cualitativa de fusiones génicas mediante la PCR final. Por lo tanto, uno de los valores límite relevantes para el ensayo es la altura mínima del pico que permite distinguir con seguridad entre el ruido de fondo técnico y la detección real del objetivo. El límite máximo de RFU se determinó en 400 RFU con datos de las pruebas de sensibilidad analítica.

## **Interferencias y reacciones cruzadas**

Los posibles interferentes que podrían influir en los resultados del procedimiento de medición se evaluaron de acuerdo con las recomendaciones de las directrices del CLSI. EP07 (3.ª edición) y EP37 (1.ª edición). Para el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit, Se determinaron los interferentes endógenos y exógenos, así como su concentración máxima esperada ( $C_{max}$ ) en la reacción PCR, tal y como se sugiere en las directrices, se sometió a ensayo y, en caso de observarse

interferencias, se ensayaron concentraciones adicionales para determinar la concentración en la que no se detectaban interferencias.

Los resultados no mostraron ningún efecto interferente del DNA interferente endógeno probado a 1 ng en la reacción PCR, cuando la digestión del DNA se llevó a cabo como parte del procesamiento de muestras.

En cuanto a la sangre interferente endógena, se observó un efecto interferente en el  $C_{max}$  calculado de 0,87 % v/v en la reacción de PCR, se realizaron diluciones adicionales hasta que no se detectó ninguna interferencia. El 0,087 % v/v de sangre no mostró interferencias. Sin embargo, la contaminación sanguínea puede detectarse visualmente en la reacción PCR o en la suspensión de RNA aislada mediante un cambio de color a naranja. Si se observa un cambio de color, recomendamos repetir el aislamiento de RNA para evitar cualquier posible interferencia.

Para los interferentes exógenos DTT, RNase Inhibitor, DNase, Ethanol, Metoclopramide, EDTA, Hydroxyurea y Citrate no se observó ningún efecto de interferencia en sus respectivos  $C_{max}$ , donde las desviaciones observadas en las muestras analizadas con respecto al grupo no tratado se encontraban dentro de los límites aceptados.

En cuanto a los interferentes exógenos, se observó interferencia de la transcriptasa inversa, la heparina y la proteinasa K en los respectivos  $C_{max}$  calculados o recomendados por CLSI EP37 (1.<sup>a</sup> edición), se probaron diluciones adicionales hasta que no se detectó ninguna interferencia. Para la enzima transcriptasa inversa, el  $C_{max}$  probado 0,2 % v/v mostró interferencia a menos que la enzima se inactivara por calor según las instrucciones de los fabricantes de kits de síntesis de cDNA probados. La heparina 3,3 U/dl y la enzima proteinasa K 0,0001 % v/v no mostraron interferencias.

Los anticoagulantes sanguíneos EDTA, citrato sódico y heparina se analizaron adicionalmente con los kits de aislamiento recomendados. No se detectó ningún impacto en el rendimiento analítico. Prevemos que el flujo de trabajo de los kits de aislamiento eliminará eficazmente cualquier sustancia interferente derivada de anticoagulantes y los reactivos de aislamiento de RNA.

**Tabla 15 Pruebas de concentraciones no interferentes de interferentes endógenos y exógenos.**

Tipo de interferente	Categoría	Interferente	Concentración probada sin interferencias
Endógeno	Componentes de la sangre total	Sangre total	0,087 % v/v en la reacción de PCR
Exógeno	Anticoagulantes	EDTA	0,099 mg/dL
		Citrato	0,004 % v/v en la reacción de PCR
		Heparina	3,3 U/dL
	Reactivos de aislamiento de RNA	Proteinase K	0,0001 % v/v en la reacción de PCR
		Etanol	0,3 % v/v en la reacción de PCR
		DNase	0,16 % v/v en la reacción de PCR
	Reactivos de transcripción inversa cDNA	DTT	0,2 % v/v en la reacción de PCR
		RNase Inhibitor	0,2 % v/v en la reacción de PCR
		Transcriptasa inversa	0,2 % v/v en la reacción de PCR <b>(inactivado por calor)</b>
	Agente antiemético	Metoclopramide	0,225 mg/dL
Agente antineoplásico	Hydroxyurea	3,08 mg/dL	

## Estabilidad durante el uso

Todos los estudios de estabilidad se planificaron de conformidad con ISO 23640:2015 y la directriz CLSI EP25- (2.<sup>a</sup> edición). Se siguió el siguiente procedimiento en todos los estudios de estabilidad: El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit se probó en múltiples puntos temporales durante diversos periodos de tiempo. Se analizaron las muestras artificiales y el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control. La evaluación final de las distintas condiciones incluyó la comparación entre las medias del punto temporal inicial (T0) y los puntos temporales posteriores (Tn) y se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$abs. \Delta_n = |\bar{x}_{T0} - \bar{x}_{Tn}|$$

Para el estudio de estabilidad durante el uso, se realizaron dos experimentos. Uno para comprobar la estabilidad tras varios ciclos de congelación y descongelación y otro para comprobar la estabilidad de los kits durante su uso simulado tras la apertura, como parte del estudio de estabilidad de la congelación, descongelación y la vida útil declarada.

Según los resultados, el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit es estable hasta 20 ciclos de congelación y descongelación, y se puede utilizar hasta 24 meses después de su apertura.

## Datos sobre el rendimiento clínico

### Diseño del estudio, aspectos éticos y normativos

El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit y los métodos de referencia se probaron en 297 muestras de pacientes y 10 voluntarios sanos. El objetivo de este estudio era proporcionar evidencia clínica de conformidad con los artículos 20 a 24 de la ley sobre productos sanitarios. 'Medizinproduktgesetz'. Utilizando los métodos de referencia citogenéticos (FISH) y/o qPCR monoplexx validado internamente se debía demostrar la concordancia con el dispositivo. La confirmación de la comisión ética responsable se recibió el 06.06.2012.

### Métodos de referencia

El objetivo principal es determinar la sensibilidad y la especificidad diagnósticas en comparación con los métodos de referencia. Como método de referencia, se realizó un Fluorescence-In-Situ-Hybridization (FISH) estandarizado para una selección de translocaciones [Grimwade et al. Blood 116: 354-65, 2010]. Las translocaciones que no pudieron determinarse mediante citogenética se analizaron con monoplex-nested-PCR- pruebas establecidas y validadas en el laboratorio de ensayos [Studel et al. Genes Chromosomes Cancer 37: 237-51, 2003, van Dongen et al. Leukemia 13: 1901-28, 1999].

## Extracción y purificación de RNA

Se recogieron células mononucleares (MNC) de las muestras con centrifugación en gradiente de densidad. Posteriormente, se llevó a cabo el aislamiento total de RNA y la transcripción inversa a ADNc utilizando kits disponibles en el mercado. Se analizó la calidad del cDNA a través de PCR en tiempo real. Los ensayos de PCR validados sirvieron para confirmar los genes fusionados y las mutaciones.

## Resultados

El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit no mostró resultados falsos positivos con el cDNA probado de los 10 voluntarios sanos.

De las 297 muestras de pacientes analizadas, 5 no pudieron evaluarse debido a que se detectó el control interno ABL por debajo del umbral recomendado. De las 292 muestras restantes, 201 mostraron resultados verdaderamente negativos en comparación con los métodos de referencia.

Los resultados individuales de las pruebas comparativas se resumen en la [Tabla 16](#). Las fusiones génicas PICALM::MLLT10 (CALM-AF10) y KMT2A::MLLT4 (MLL-AF6) no se pudieron evaluar la sensibilidad diagnóstica, ya que no se disponía de muestras precaracterizadas positivas.

En general, se logró una sensibilidad diagnóstica del 94 % y una especificidad diagnóstica del 99,5 %.

**Tabla 16 Conclusión de los resultados de los datos de rendimiento clínico del Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit.** \*Los datos sobre prevalencia se han extraído de Grimwade et al. 2010. n.e. = no evaluado

Biomarcador			Evaluación del rendimiento clínico (n = 292)						Sensibilidad diagnóstica [%]	Especificidad diagnóstica [%]
Fusión génica	Aberración crom.	Variante	Prev* [%]	Verdadero positivo	Verdadero negativo	Falso positivo	Falso negativo			
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								

Biomarcador	Evaluación del rendimiento clínico (n = 292)									
	Fusión génica	Aberración crom.	Variante	Prev* [%]	Verdadero positivo	Verdadero negativo	Falso positivo	Falso negativo	Sensibilidad diagnóstica [%]	Especificidad diagnóstica [%]
CBFB::MYH11	inv(16) (p13;q22)	Tipo A	5	28	262	0	2	93,3	100,0	
		Tipo B								
		Tipo C								
		Tipo D								
		Tipo E								
		Tipo F								
		Tipo G								
		Tipo H								
		Tipo J								
		DEK::NUP214	t(6;9) (p23;q34)	n. b.	1	3	289	0	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								
KMT2A-PTD	Parcial	e9e3	5-7	23	269	0	0	100,0	100,0	
		Tandem	e10e3							
		Duplicación	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) (q22;q21)	bcr1	13	8	284	0	0	100,0	100,0	
		bcr2								
		bcr3								
Resumen			37	85	201	1	5	94,4	99,5	

## Evaluación diagnóstica

Las características de rendimiento clínico del Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit mostraron resultados aceptables. Los parámetros para la evaluación del rendimiento clínico se calcularon de acuerdo con el anexo I, sección 9.1b del Reglamento (UE) 2017/746 sobre dispositivos médicos para diagnóstico in vitro, tal y como se muestra en la Tabla 17.

**Tabla 17 Características diagnósticas del Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit**

Característica diagnóstica	Estimación	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
Sensibilidad diagnóstica	94,4 %	87,7 %	97,6 %
Especificidad diagnóstica	99,5 %	97,3 %	99,9 %
Valor predictivo positivo	98,8 %	93,7 %	99,8 %
Valor predictivo negativo	97,6 %	94,4 %	99,0 %
Precisión diagnóstica	98,0 %	95,6 %	99,1 %

## Control de calidad

Todos los componentes del kit se someten a un exhaustivo proceso de control de calidad en BIOTYPE GmbH. La calidad de los kits de prueba se supervisa permanentemente para garantizar su uso sin restricciones. Póngase en contacto con nosotros si tiene alguna pregunta sobre el control de calidad.

## Asistencia técnica

Para obtener asesoramiento técnico, póngase en contacto con nuestro equipo de atención al cliente:

**e-mail:** [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)

**Teléfono:** +49 (0)351 8838 400

## Referencia

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, Kinkel, 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.

## Limitaciones de uso

- Se deben seguir los procedimientos descritos en este manual. Cualquier desviación puede dar lugar a un fallo en el ensayo o provocar resultados erróneos.
- El uso de este producto está limitado a usuarios profesionales de laboratorio especialmente formados en técnicas de PCR y electroforesis capilar en gel.
- Para obtener resultados óptimos en esta prueba, es necesario seguir procedimientos adecuados de recogida, transporte, almacenamiento y procesamiento de las muestras.
- Este ensayo no debe utilizarse directamente sobre la muestra. Antes de utilizar este ensayo, deben llevarse a cabo métodos adecuados de extracción de ácido nucleico.
- El kit solo ha sido validado para su uso con los reactivos, instrumentos y software descritos en el capítulo Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados
- El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> ha sido diseñado, validado y certificado como herramienta de cribado para la clasificación de subtipos de LMA. Esta aplicación no es adecuada para cuantificar el número de copias, como

en el caso de la monitorización de Minimal Residual Disease (MRD) o para validar otros subtipos de leucemias o LMA pediátrica.

- Debido a la variabilidad genética, single nucleotide polymorphism (SNPs) o insertion deletion polymorphism (INDELs) pueden afectar a la eficacia del cebador o a la accesibilidad de la plantilla. Un análisis de la versión más reciente del ensamblaje del genoma humano (HG38) para todos los grupos étnicos solo encontró un SNP crítico que provoca la pérdida de la función del cebador. El alelo variante se da en el 0,6 % de la población africana y se localiza dentro del sitio de unión del cebador para PICALM::MLLT10, un gen de fusión poco frecuente con una prevalencia inferior al 1 %. Sin embargo, debido a la baja prevalencia de la fusión génica, junto con la baja probabilidad de que se produzcan SNP en la población mundial, el riesgo de resultados falsos negativos es bajo. En caso de duda, considere confirmar los resultados utilizando métodos de referencia.
- Se requiere una buena práctica de laboratorio para garantizar el rendimiento del kit.
- Los resultados deben ser interpretados por un profesional sanitario cualificado.
- La interpretación de los resultados debe tener en cuenta la posibilidad de resultados falsos negativos y falsos positivos.
- No utilice componentes caducados o almacenados incorrectamente.

## Información para realizar pedidos

Envíe sus pedidos por correo electrónico a [sales@biotype.de](mailto:sales@biotype.de).

Producto	Tamaño del envase	Número de pedido
Mentype® AMLplex <sup>QS</sup> PCR Amplification Kit	25 reacciones	45-12100-0025
	100 reacciones	45-12100-0100
	400 reacciones	45-12100-0400
Matrix Standard BT5 multi	1 x 25 µL	45-15100-0025
	2 x 25 µL	45-15100-0050

## **Marcas comerciales y exenciones de responsabilidad**

Mentype® es una marca comercial registrada de BIOTYPE GmbH.

Otras marcas comerciales: ABI PRISM®, SuperScript™ GeneMapper®, GeneAmp® y Applied Biosystems® (Applied Biosystems LLC group); QIAamp® (Qiagen); POP-4™, POP-1™, POP-7™ (Europe: Applied Biosystems LLC, US: Life Technologies Corporation). La PCR está protegida por patentes. Los titulares de patentes son Hoffmann-La Roche Inc. y F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Los nombres registrados, marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, aunque no estén específicamente señalados como tales, no deben considerarse desprotegidos por la ley.

El Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit es un kit de diagnóstico con marcado CE conforme al Reglamento europeo sobre productos para diagnóstico in vitro (UE) 2017/746.

Producto sin licencia para Health Canada y no aprobado por la FDA.

No disponible en todos los países.

© 2025 BIOTYPE GmbH; Todos los derechos reservados.

## Explicación de los símbolos



Fabricante



Código de lote



Contiene reactivos suficientes para <N> pruebas.



Consulte las instrucciones de uso electrónicas (eIFU).



Fecha de caducidad



Límite de temperatura



Número de catálogo



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro



Mantener alejado de la luz solar.



Mantener seco



Unique device identifier

Otros símbolos utilizados en estas instrucciones de uso:



Consejos útiles



¡Atención, asegúrese de seguir este aviso!

texto subrayado en azul

Enlaces que conducen a contenidos externos, como páginas de inicio, direcciones de correo electrónico

texto subrayado en negro

Enlaces cruzados en el documento para facilitar la navegación.

*texto sangrado, cursiva, negrita*

Campos en los que hay que hacer clic en un software

## Apéndice

### Lista de genes diana

Gen	Nombres alternativos	Identificación de la transcripción
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

## Electroferogramas de muestras de referencia

En las páginas siguientes encontrará ejemplos de electroferogramas de Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder ([Figura 2](#)), el Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control (PC, [Figura 3](#)) y un control sin plantilla (NTC, [Figura 4](#)).

Todas las muestras se amplificaron en un ciclador ProFlex de PCR y analizadas en un 3500 Genetic Analyzer (POP-4, matriz de 36 cm) utilizando el parámetro de ejecución validado. El análisis de los datos se realizó utilizando GeneMapper ID-X versión 1.6. Bins, Panels, y Analysis method según la [Tabla 11](#).

Los electroferogramas se amplían a una longitud de fragmento de 50 a 560 pb (eje x). La escala del eje y se realizó de forma individual:

[Figura 2](#), página [58](#): Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder: 3,000 RFU

[Figura 3](#), página [59](#): Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control: 9,000 RFU

[Figura 4](#), página [60](#): Control sin plantilla (NTC): 9,000 RFU

## Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder

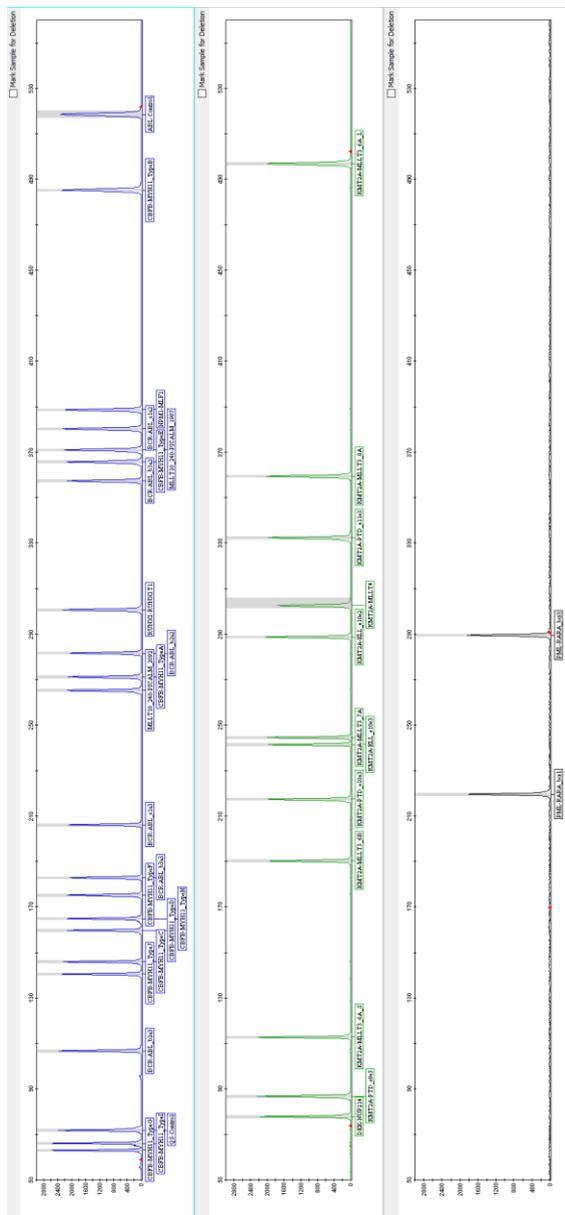


Figura 2 Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder

### Mentype<sup>®</sup> AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control (PC)

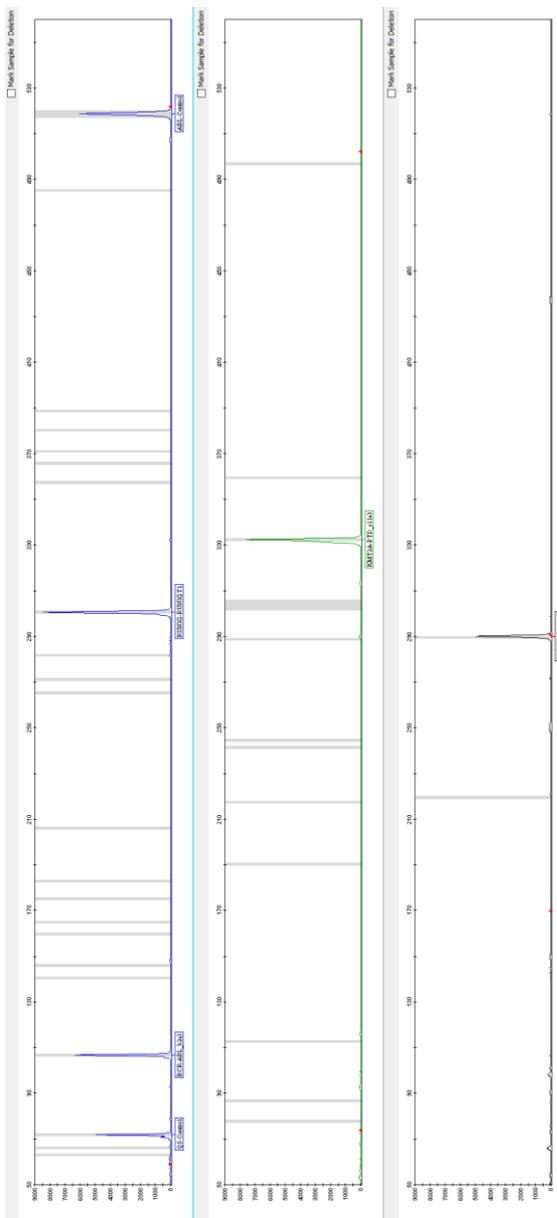


Figura 3 Mentype<sup>®</sup> AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control (PC)

### No template control (NTC)

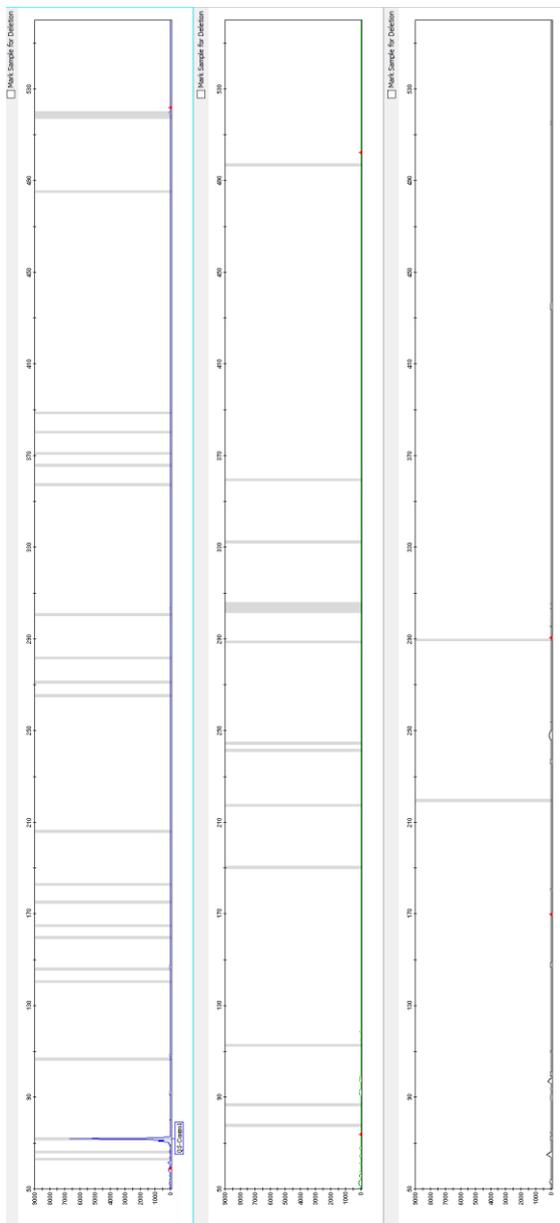


Figure 4 No template control (NTC)

---

**BIOTYPE GmbH**

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Tel.: +49 351 8838 400

Fax: +49 351 8838 403

[www.biotype.de](http://www.biotype.de)

**Pedidos**

[sales@biotype.de](mailto:sales@biotype.de)

**Servicio de atención al cliente y asistencia técnica**

[support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)

