

Mentype[®] AMLplex^{QS}

PCR Amplification Kit

Instruções de utilização (IFU)



Para utilização em diagnóstico in vitro

AMLIFU02v2pt
23/07/2025



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



Código do lote



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY
Site: www.biotype.de
e-mail: support@biotype.de
Encomendas: sales@biotype.de



Aviso de alterações

Observar as seguintes adaptações em comparação com a versão anterior das instruções de utilização:

Código do documento	Alterações	Data
AMLIFU02v1pt	Versão inicial	28/05/2025
AMLIFU02v2pt	Atualizar a tabela 8	23/07/2025

Pode ser disponibilizada gratuitamente uma versão impressa destas instruções de utilização num prazo de 7 dias.

Para outras questões, contacte-nos

pelo número +49 351 8838 400 ou pelo e-mail support@biotype.de

Índice

Finalidade	4
Contexto científico	4
Descrição do produto	5
Materiais fornecidos	7
Descrição dos componentes	8
Conservação e manuseamento dos reagentes	9
Material e dispositivos necessários, mas não fornecidos	9
Equipamento geral de laboratório	9
Reagentes, kits e consumíveis	10
Instrumentos e software	11
Espécimes e amostras de teste	12
Avisos e precauções	13
Aviso para o utilizador	14
Procedimento	15
Visão geral do fluxo de trabalho experimental	15
Preparação da amostra.....	15
Preparação do controlo	19
Preparação da mistura principal	19
Amplificação da PCR	21
Eletroforese capilar em gel	23
Preparação de produtos PCR	23
Análise do comprimento dos fragmentos.....	24
Análise de dados	26
Procedimento geral para a análise de dados	26
Análise da amostra	30
Análise de dados com GeneMapper™ ID-X	32

Deteção e resolução de falhas	36
Avaliação do desempenho	40
Controlo da qualidade	50
Assistência técnica	50
Referências.....	50
Limitações da utilização	51
Informações para encomendas	52
Marcas comerciais e exonerações de responsabilidade	53
Explicação dos símbolos	54
Anexo	56

Finalidade

O Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit é um teste manual destinado ao rastreio qualitativo de 11 fusões genéticas com um total de 34 variantes de transcrição, permitindo a identificação de aberrações cromossômicas com relevância diagnóstica, prognóstica e terapêutica para doentes adultos que tenham, ou que sejam suspeitos de ter, leucemia mieloide aguda (LMA).

O ensaio destina-se a ser usado com ADN complementar (cADN), que tenha sido transcrito reversamente a partir de ARN celular extraído de amostras de sangue total venoso periférico ou de medula óssea.

O Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit é usado na deteção de aberrações cromossômicas para decisões clínicas relevantes para a LMA. A identificação de translocações genéticas específicas permite a classificação das doenças leucémicas e oferece informações essenciais para a fundamentação do diagnóstico que determina o tratamento dos doentes focado no risco.

O Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit destina-se a utilizadores de laboratório profissionais, com formação em técnicas de genética molecular, PCR multiplexada e no manuseamento do Genetic Analyzer da Thermo Fisher Scientific (departamento Applied Biosystems).

Contexto científico

A verificação de aberrações cromossômicas específicas tem um elevado valor de prognóstico em quase todos os tipos de leucemia aguda. A demonstração biológica molecular de aberrações cromossômicas (translocações) representa um complemento diagnóstico importante. A deteção de translocações específicas permite a classificação do subtipo de doenças leucémicas e oferece informações essenciais para o tratamento dos doentes focado no risco.

O Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit facilita a deteção das aberrações cromossômicas mais comuns observadas até agora na LMA e representa uma ferramenta de rastreio fiável, fácil de usar e compatível com a rotina.

Descrição do produto

O Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit contém reagentes otimizados para a detecção de alta resolução de 11 fusões genéticas com 34 variantes de transcrição no total (ver [Tabela 1](#)). A designação das variantes segue nomenclaturas historicamente estabelecidas, sobretudo para KMT2A (Schnittger et al., 2000). Uma lista completa de genes, os respetivos nomes alternativos e as IDs de transcrição, usadas para descrições sistemáticas das variantes, podem ser encontrados no anexo (ver [Lista de genes-alvo](#)).

O kit do teste inclui um controlo PCR interno (Quality Sensor “QS-Control”), que é independente da presença de amostra, e um controlo cADN dependente da presença de amostra (ABL-Control), com informações úteis sobre a eficiência da PCR, a qualidade das amostras cADN usadas e a presença de inibidores da PCR.

O teste é realizado através da análise dos fragmentos utilizando eletroforese capilar em gel. Um primer para cada transcrição está marcado por fluorescência com 6-FAM, BTG ou BTY, os espectros de cores do acessório Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE, GmbH).

Tabela 1 Fusões genéticas e variantes de transcrição detetáveis com Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit

Fusão genética	Aberração cromossómica	Variante	Descrição sistemática da variante
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
		Type E	CBFB:e5::MYH11:e28
		Type F	CBFB:e4::MYH11:e33

Fusão genética	Aberração cromossómica	Variante	Descrição sistemática da variante
		Type G Type H Type I Type J	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

O teste foi validado pelo rastreio da fusão genética em ~ 300 doentes com LMA e a sua adequabilidade foi confirmada num estudo comparativo de avaliação clínica.

O limite de deteção para a avaliação qualitativa é de 400 RFU. Em média, pode ser detetado um mínimo de 1000 cópias para cada fusão genética.

Em geral, a quantidade introduzida em condições normais na reação de transcrição reversa é definida como 100 ng a 1 µg de ARN, total isolado do sangue total ou da medula óssea.

A quantidade ideal introduzida na transcrição reversa para a medula óssea é definida como 500 ng de ARN e 1 µg de ARN para o sangue periférico. É então usado 1 µL de cADN durante a PCR.

Materiais fornecidos

Tabela 2 Conteúdo do Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit

Reagente	Cor da tampa	Volume por tamanho de embalagem		
		25 reações	100 reações	400 reações
Nuclease-Free Water	Azul-claro	1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Roxo	125 µL	500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® AMLplex ^{QS} Primer Mix	Vermelho	63 µL	250 µL	4 x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Branco	10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Positive Control	Branco	25 µL	25 µL	25 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Laranja	13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Allelic Ladder	Verde	25 µL	25 µL	4 x 25 µL

Pode ser encontrada uma visão geral dos números de lote dos componentes no rótulo no interior da aba da caixa.

NOTA

Note-se que o tamanho da embalagem descreve o número de testes **sem** ter em conta o número de controlos necessários ou o excesso exigido para a pipetagem.

Recomendamos a utilização do tamanho seguinte para o débito correspondente:

i

- < 8 amostras por corrida PCR: Tamanho de embalagem de 25 reações
- 8 - 45 amostras por corrida PCR: Tamanho de embalagem de 100 reações
- > 45 amostras por corrida PCR: Tamanho de embalagem de 400 reações

Descrição dos componentes

Nuclease-Free Water: Água de qualidade PCR, usada na preparação da PCR e enquanto controlo negativo sem ADN (NTC).

Reaction Mix A: Tampão PCR contendo dNTPs e MgCl₂. O tampão PCR é otimizado para promover a atividade enzimática para PCR.

Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix: mistura de primers de oligonucleótidos multiplexados contendo um iniciador marcado (rótulo: 6-FAM™, BTG, BTY) e primers não marcados.

Multi Taq 2 DNA Polymerase: Taq ADN polimerase de arranque a quente, 2,5 U/μl.

Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control: mistura de ADN de cadeia dupla artificial de cinco fragmentos. Usa-se como controlo PCR qualitativo externo, que é positivo para os seguintes alvos nos 3 painéis: BCR::ABL_b2a3, RUNX1::RUNX1T1, ABL-control, KMT2A-PTD_e11e3 e PML::RARA_bcr3, e adicionalmente QS-Control é amplificado como marcador da qualidade para a validade da amostra.

NOTA



O Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control não é crítico para o profissional de laboratório, dado consistir em moléculas individuais de ADN purificadas, não perigosas e sem funções biológicas ativas. Não contém células vivas ou organismos patogénicos que pudessem representar uma ameaça direta.

DNA Size Standard 550 (BTO): mistura de fragmentos PCR marcados por fluorescência com comprimentos de fragmento definidos entre 60 e 550 bp, sendo o componente adicionado a cada produto PCR antes da análise do comprimento dos fragmentos e usado para uma regressão do tamanho para determinar com exatidão o comprimento dos fragmentos dos produtos PCR.

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder: uma mistura de fragmentos PCR marcados por fluorescência representando todos os alelos detetáveis do Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit. Inclui 22 fragmentos marcados com 6-FAM™, 12 fragmentos marcados com BTG e 2 fragmentos marcados com BTY, usados como referência de genotipagem para a identificação exata dos alelos.

Conservação e manuseamento dos reagentes

O kit é expedido em gelo seco. Os componentes do kit devem chegar congelados, exceto Multi Taq 2 DNA Polymerase, que é conservado num tampão para impedir que o reagente fique congelado.

Verificar o kit quanto a integridade no momento da receção. Não usar kits que tenham chegado descongelados. Se um ou mais componentes não estiverem congelados ou se houver tubos na embalagem que tenham ficado comprometidos durante a expedição, o desempenho previsto não está garantido.

Conservar todos os componentes entre -25 °C e -15 °C ao abrigo da luz. Em especial, Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix, DNA Size Standard 550 (BTO) e Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder têm de ser conservados ao abrigo da luz.

Para evitar a contaminação, recomendamos que os componentes de pré-amplificação (amostras de ARN e de cADN, Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control) e os componentes de pós-amplificação (DNA Size Standard 550 (BTO) e Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder) sejam conservados e usados em separado dos reagentes PCR (Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A e Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix).

O prazo de validade do kit está indicado no rótulo da caixa do kit ou é de 24 meses a contar da abertura, o que ocorrer primeiro. Não exceder um máximo de 20 ciclos de congelamento/descongelamento.

Material e dispositivos necessários, mas não fornecidos

Equipamento geral de laboratório

- Centrífuga de bancada com um rotor para tubos de reação de 2 mL e de 200 µL
- Centrífuga com um rotor para placas de microtitulação para placas de reação de 96 poços
- Agitador de vórtex
- Pipetas calibradas ajustáveis com pontas de filtro justas descartáveis para aerossóis
- Placas de reação de 96 poços adequadas de 200 µL ou tubos de reação de 200 µL como o respetivo material de fecho, qualidade PCR

- Racks adequados para tubos de reação de 2 mL e 200 µL
- Rack de arrefecimento adequado para tubos de 2 mL
- Luvas sem pó descartáveis
- NanoDrop™ One Spectrophotometer ou Qubit™ Fluorometer

NOTA

Todo o material usado para PCR tem de ser de qualidade adequada (sem ADN e para biologia molecular). Verificar se todos os instrumentos usados foram instalados, calibrados, verificados e sujeitos a manutenção de acordo com as instruções e as recomendações do fabricante.

Reagentes, kits e consumíveis

Tabela 3 Reagentes necessários, mas não fornecidos

Note-se que alguns reagentes e consumíveis são usados em determinadas combinações, não sendo todos eles necessários em todas as corridas.

Reagente	Fornecedor	Número de encomenda
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
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

Reagente	Fornecedor	Número de encomenda
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 e software

Além dos métodos de extração manuais com base na coluna, conforme descrito no capítulo Preparação da amostra, pode ser usada a seguinte automação para a extração de ARN:

- Dispositivo Maxwell® CSC (ref.: AS6000, Promega)

O Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit foi validado para ser usado com os seguintes termocicladores de PCR:

- ProFlex PCR System (ref.: 4484073 (3 blocos de amostras de 32 poços), 4484075 (bloco de amostras de 96 poços); Thermo Fisher Scientific)
- GeneAmp® PCR System 9700 Silver (descontinuado, Thermo Fisher Scientific)
- Mastercycler nexus gradient (ref.: 6331000017, Eppendorf AG)
- Mastercycler ep-S (descontinuado, Eppendorf AG)
- Biometra Tadvanced (ref.: 846-2-070-211; Analytik Jena)

Qualquer aplicação dos termocicladores PCR diferente da anteriormente referida tem de ser validada pelo utilizador. As seguintes especificações têm de ser satisfeitas:

- Tampa aquecida
- Bloco adequado para placas/tubos de reação de 200 µL
- Rampa ajustável até 4 °C/s

O Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit foi validado para ser usado com os seguintes instrumentos e definições:

- Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), versão de software 4.0.1
 - 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
- SeqStudio™ Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), versão de software 1.2.4

A análise de dados foi realizada com o software:

- GeneMapper™ ID-X software, versão 1.6 (Thermo Fisher Scientific), usando:
 - Analysis Method: AMLplexIVD_Analysis1_v1x ou AMLplexIVD_Analysis4_v1x ou AMLplexIVD_Analysis7_v1x
 - Bins: AMLplexIVD_Bins1_v1x ou AMLplexIVD_Bins4_v1x ou AMLplexIVD_Bins7_v1x
 - Panels: AMLplexIVD_Panel1_v1x ou AMLplexIVD_Panel4_v1x ou AMLplexIVD_Panel7_v1x
 - Size Standard: BTO_60-550_v1x

Uma avaliação manual dos ficheiros fsa, ou qualquer resultado obtido com o software para a recolha de dados sem o software descrito para a análise e a avaliação de dados, não é validado.

NOTA



Verificar se todos os instrumentos usados foram instalados, calibrados, verificados e sujeitos a manutenção de acordo com as instruções e as recomendações do fabricante.

Espécimes e amostras de teste

Os seguintes espécimes foram validadas com o Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit:

- Amostras de sangue venoso periférico humano (EDTA, citrato, heparina e estabilizador RNA Exact), conservadas a 4 °C e processadas para purificação de ARN num prazo de 24 h.
- Amostras de medula óssea (EDTA, heparina), conservadas a 4 °C e processadas para purificação de ARN num prazo de 24 h.

O ARN obtido deve ser conservado não- diluído entre -85 °C e -70 °C.

NOTA



Verificar se o anticoagulante usado para a colheita de sangue é compatível com as instruções do fabricante do kit de isolamento de ARN.

Avisos e precauções

- Ler atentamente as instruções de utilização antes da utilização do produto.
- Ler as fichas de dados de segurança (SDS) e a declaração de substâncias não-perigosa (NHS) para todos os produtos BIOTYPE, disponíveis a pedido ou através de (www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter). Para produtos que não exijam uma SDS, visto não conterem SVHC, ou serem sujeitos a outras restrições do regulamento 1272/2008 (CLP), a BIOTYPE disponibiliza a SDS a pedido.
- Contactar o fabricante dos materiais e dos reagentes necessários, mas não fornecidos, para cópias da SDS para eventuais reagentes adicionais necessários.
- Não podem ser misturados componentes de kit de lotes diferentes.
- Não é permitida a aliquotagem dos componentes do kit em outros recipientes de reação.
- A utilização deste produto está limitada a utilizadores profissionais de laboratório, com formação em técnicas de genética molecular, PCR multiplexada e no manuseamento de Genetic Analyzers da Thermo Fisher Scientific.
- Antes da primeira utilização, verificar o produto e os respetivos componentes quanto a:
 - Integridade

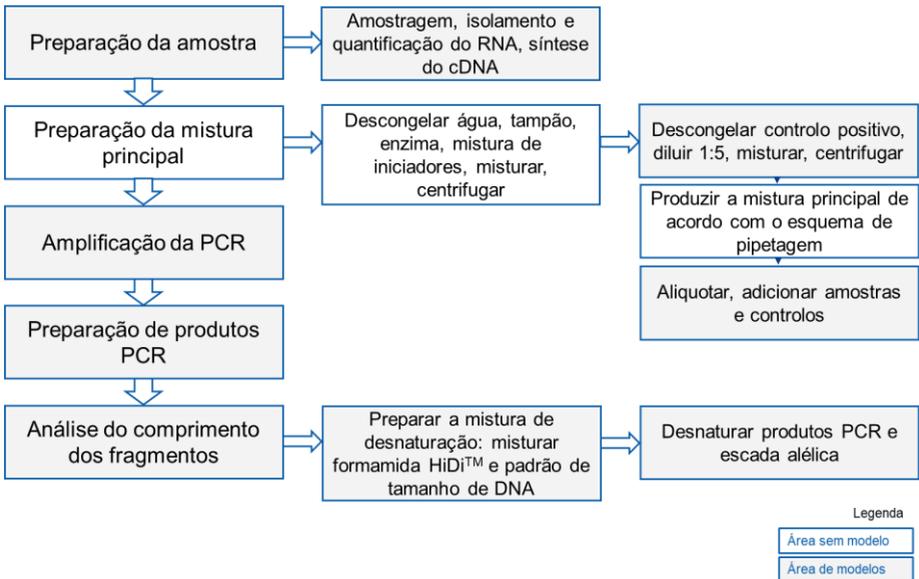
- Todos os dados relativos a número, tipo e capacidade (ver capítulo Materiais fornecidos)
- Rotulagem correta
- Estado de congelamento à chegada (exceto Multi Taq 2 DNA Polymerase)
- As amostras devem ser sempre tratadas como infecciosas e/ou como representando um perigo biológico de acordo com os procedimentos de segurança do laboratório.
- Não usar kits com o prazo de validade expirado.
- Descartar os resíduos de amostras e de testes de acordo com os regulamentos locais relativos a segurança e eliminação.
- Todos os instrumentos usados foram instalados, calibrados, verificados e sujeitos a manutenção de acordo com as instruções e as recomendações do fabricante.

Aviso para o utilizador

O utilizador tem de comunicar ao fabricante qualquer problema ocorrido relacionado com o produto. Qualquer incidente grave relacionado com este kit tem de ser comunicado ao fabricante e à autoridade competente do Estado-membro no qual o utilizador e/ou o doente está estabelecido. Foi criado um ù (SSP), em conformidade com o artigo 29 do regulamento (UE) 2017/746, destinado a permitir o acesso público, através da base de dados EUDAMED, a um resumo atualizado dos dados de segurança e de desempenho do dispositivo para os utilizadores previstos, que, no caso deste produto, são exclusivamente profissionais de laboratório.

Procedimento

Visão geral do fluxo de trabalho experimental



Preparação da amostra

Requisitos da amostra biológica

A amostra para Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit é definida como transcrita de cADN de ARN extraído de sangue total venoso periférico ou de medula óssea de seres humanos.

Recomendamos a utilização de reagentes para estabilização do ARN durante a colheita da amostra. Os estabilizadores de ARN ajudam a preservar a integridade do ARN (p. ex., S-Monovette RNA Exact). O isolamento do ARN deve ser feito logo a seguir à colheita da amostra.

NOTA

i

Uma conservação prolongada do material da amostra pode causar uma fragmentação do material genético e, assim, a uma qualidade insuficiente do material. Isto pode piorar o resultado da análise, p. ex., através de sinais reduzidos ou de controlos internos inválidos.

Sangue

Colher, pelo menos, uma amostra de 200 µL de sangue total venoso periférico para o seguinte procedimento.

O manuseamento de sangue total venoso periférico deve seguir a recomendação da diretriz Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) MM05–A2 (2.^a edição), onde é referido que o sangue total pode ser conservado à temperatura ambiente (22 °C a 25 °C) por um período até 24 horas, ou entre 2 °C e 6 °C durante 72 horas ou mais. Além disso, recomenda-se que os anticoagulantes usados para a colheita de sangue total sejam EDTA, citrato ou heparina.

Medula óssea

Colher, pelo menos, uma amostra de 200 µL de medula óssea para o seguinte procedimento.

O manuseamento de aspirados de medula óssea deve seguir a recomendação da diretriz CLSI MM05–A2 (2.^a edição), onde é referido que os aspirados de medula óssea anticoagulados (EDTA ou citrato) devem ser conservados e transportados a 4 °C. Para os melhores resultados, o ARN deve ser extraído num prazo de 1 h - 4 h depois da colheita da amostra.

Extração de ARN

Executar a extração e a purificação de ARN de sangue total periférico (PB) ou de aspirados de medula óssea (BM) com um dos seguintes kits:

- RNeasy® Midi/ Mini/ Plus Mini Kit (Qiagen GmbH) para anticoagulantes EDTA, citrato e heparina em BM e PB

- NucleoSpin® Dx RNA Blood (Macherey-Nagel) para estabilizador RNA Exact em PB
- Maxwell® CSC RNA Blood Kit (Promega) para anticoagulantes EDTA e heparina em BM

Seguir os manuais e as recomendações do fabricante para a extração de ARN. Recomenda-se a execução de uma **digestão de DNase** durante o isolamento de acordo com as instruções do fabricante.

NOTA



A contaminação do sangue pode ser vista na reação PCR ou no ARN isolado pela mudança para a cor laranja. Se a cor mudar, recomendamos a repetição do isolamento do ARN para evitar potenciais interferências

NOTA



Eliminar qualquer vestígio de etanol antes da eluição do ácido nucleico. O etanol é um inibidor forte da PCR.

Quantificação e diluição do ARN

Quantificar a concentração do ARN por espectroscopia UV/visível a 260 nm com o NanoDrop™ One spectrophotometer ou por espectroscopia de fluorescência com o Qubit™ Fluorometer.

Ao usar a espectrofotometria, usar o tampão de eluição do kit de extração de ARN para medir o branco. A relação A260/A280 deve situar-se no intervalo 1,9 - 2,1, ao passo que a relação A260/A230 deve situar-se no intervalo 1,8 – 2,3.

Para a quantificação fluorométrica do ARN, pode ser usado o Qubit™ Fluorometer com o Qubit™ RNA HS Assay-Kit ou o Qubit™ RNA BR Assay-Kit.

Para usar com o Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit, diluir as amostras de ARN numa concentração adequada para a transcrição

subsequente para cADN. Preparar a diluição no momento da utilização. Usar água sem nuclease como diluente.

NOTA



A quantidade para a transcrição para o cADN segue as instruções do fabricante do kit de transcrição. São validadas utilizações de ARN de 100 ng - 1 µg num volume de reação final de 20 µL para a síntese de cADN para os dois tipos de amostra. Idealmente, recomendamos a utilização de **500 ng para medula óssea** e de **1 µg para sangue periférico**.

Conservação do ARN

Conservar as amostras de ARN não-diluídas em água sem ARNse entre -25 °C e -15 °C até 24 horas ou entre -85 °C e -70 °C até um ano.

Transcrição para o cADN

Efetuar a síntese de cDNA de acordo com as instruções do fabricante, utilizando um dos seguintes 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 pequenas quantidades de ARN

NOTA



A **inativação por calor** da transcriptase reversa é essencial para o desempenho da PCR. Consultar as instruções do fabricante para mais informações.

Conservação do cADN

Conservar as amostras de cADN entre -25 °C e -15 °C por um período até um ano.

Preparação do controlo

Controlo positivo PC

Descongelar o Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control, homogeneizá-lo cuidadosamente em vórtex seguido de uma breve centrifugação.

Diluir o Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control 1:5 com a Nuclease-Free Water incluída no kit. P. ex., misturar 1 µL do controlo com 4 µL da Nuclease-Free Water.

Homogeneizar cuidadosamente em vórtex o PC diluído. A seguir, centrifugar por instantes o PC diluído (aprox. 5 s).

Não conservar o controlo positivo diluído.

NOTA



Aplicar sempre uma diluição fresca do Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control.

Controlo negativo sem ADN NTC

Usar a água sem nuclease incluída no kit como controlo negativo sem ADN NTC em vez de uma amostra.

Preparação da mistura principal

Remover e descongelar os seguintes componentes do Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit:

- Nuclease-Free Water (tampa azul-clara)
- Reaction Mix A (tampa roxa)
- Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix (tampa vermelha)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (tampa branca)

Todos os componentes congelados têm de ser descongelados à temperatura ambiente (22 °C a 25 °C, aprox. 30 min, ao abrigo da luz) e homogeneizados invertendo os tubos, por pipetagem ou em vórtex delicado. A seguir, centrifugar por instantes os reagentes (aprox. 5 s). Antes da preparação da mistura principal, recomenda-se a conservação da Multi Taq

2 DNA Polymerase num ambiente arrefecido durante o maior período possível (p. ex., rack de arrefecimento).

NOTA

Misturar a Multi Taq 2 DNA Polymerase agitando para uma estabilidade mais prolongada – **não agitar a enzima em vórtex.**

Preparar a mistura principal PCR de acordo com a Tabela 4 num tubo de microcentrifuga de tamanho, adequado para o número total de amostras a testar. numa área limpa específica. Incluir, pelo menos, um PC e um NTC no cálculo.

NOTA

Regra geral, caso estejam a ser testadas menos de 10 amostras, usar mistura principal suficiente para mais uma amostra. Caso estejam a ser testadas 10 ou mais amostras, usar um volume excedentário de +10% da mistura principal de reagente.

Tabela 4 Preparação da reação de mistura principal PCR

Componente	Volume		
	N.º 1	N.º 5	N.º 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
Modelo de cADN ou amostra de controlo*	1,0 µL	5 x 1,0 µL	10 x 1,0 µL
Volume total	25,0 µL	125,0 µL	250,0 µL

*A quantidade das amostras/modelos podem ser aumentados para 2 µL, ajustando, para isso, o volume de água sem nuclease.

Agitar cuidadosamente a mistura principal em vórtex e centrifugar por instantes.

Aliquotar 24,0 µL da mistura principal PCR em tubos PCR de 200 µL preparados e centrifugar por instantes os tubos fechados.

Aplicação de modelos e controlos de cADN

Adicionar 1,0 µL dos tipos de amostra a testar aos tubos de PCR preparados contendo a mistura principal PCR.

NTC: adicionar 1,0 µL de água sem nuclease em vez de uma amostra.

Modelo de cADN: adicionar 1,0 µL das amostras de cADN não-diluídas.

PC: adicionar 1,0 µL do Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control recém-preparado e diluído 1:5 em vez de uma amostra.

NOTA



Começar por preparar o NTC para evitar contaminações do controlo. Deixar a preparação do PC para o fim para evitar contaminações cruzadas das amostras.

NOTA



Usar, pelo menos, um controlo positivo PC e um controlo negativo sem ADN NTC por corrida. Caso contrário, a corrida não pode ser validada.

Fechar todos os tubos de PCR, agitar cuidadosamente em vórtex e centrifugar.

Amplificação da PCR

Programar o termociclador PCR com o seguinte perfil de amplificação, definindo a rampa para 4 °C/s. Executar um PCR de "arranque a quente" para ativar a polimerase e prevenir a formação de produtos de amplificação não-específicos.

NOTA

A utilização de termocicladores PCR calibrados e com a manutenção em dia é essencial, dado que os desvios podem prejudicar a amplificação de alvos sensíveis, como KMT2A::MLLT4.

Tabela 5 Protocolo da PCR

Temperatura	Tempo	
96 °C	4 min	(arranque a quente para ativação da polimerase)
96 °C	30 s	
60 °C	120 s	25 ciclos
72 °C	75 s	
68 °C	10 min*	
10 °C	∞	Manter

* Caso se observe uma quantidade superior de picos de adenina negativos (-1 bp), é possível uma extensão até 60 min.

NOTA

Se forem usados termocicladores com taxas ajustáveis de aquecimento e arrefecimento, **a rampa deve ser ajustada para 4 °C/s** para um equilíbrio ideal do kit.

NOTA

Para informações básicas relativamente à configuração, programação e manutenção dos diversos instrumentos PCR, consultar o manual do utilizador do instrumento em questão.

Eletroforese capilar em gel

Preparação de produtos PCR

Uma vez concluída a PCR, remover as amostras do termociclador e centrifugar por instantes.

NOTA



Uma vez concluída a PCR, os produtos PCR podem ser conservados durante 4 semanas entre 2 °C e 8 °C ou a longo prazo entre -25 °C e -15 °C ao abrigo da luz.

Descongelar, misturar e centrifugar os reagentes:

- Formamida Hi-Di™ (não incluído no kit)
- Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder (tampa verde)
- DNA Size Standard BTO (550) (tampa laranja)

Preparar a mistura de desnaturação descrita na [Tabela 6](#) e adicionar uma ou duas reações para compensar as variações de pipetagem. Incluir uma reação extra para a escada alélica.

Tabela 6 Mistura de desnaturação

Componente	Volume por reação
Formamida Hi-Di™	12,0 µL
DNA Size Standard BTO (550)	0,5 µL

Pipetar 12,0 µL da mistura de desnaturação nos poços de uma placa PCR (indicada para utilização no Genetic Analyzer).

Adicionar 1,0 µL do produto PCR ou 1,0 µL Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder nos poços. Selar a placa PCR com película adequada, agitar em vórtex e centrifugar a placa por instantes.

NOTA



A escada alélica é usada para corretamente identificar os fragmentos analisados durante a análise de dados. Em cada corrida de análise do comprimento dos fragmentos, a escada alélica tem de ser analisada, pelo menos, uma vez para garantir uma análise de dados bem-sucedida.

NOTA



Os capilares do dispositivo de eletroforese em gel nunca podem funcionar a seco. Se as amostras não ocuparem todas as posições capilares, encher os poços adicionais da placa com 12,0 µL de formamida Hi-Di™ de acordo com o número de capilares.

Desnaturar os produtos preparados PCR num termociclador durante 3 minutos a 95 °C e arrefecer as amostras até 4 °C no termociclador. Centrifugar as amostras por instantes antes da análise do comprimento dos fragmentos.

Análise do comprimento dos fragmentos

Antes da execução da primeira análise do comprimento dos fragmentos, executar o **Matrix Standard BT5 multi** (BIOTYPE GmbH) para um alinhamento espectral dos corantes fluorescentes usados para o Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit (6-FAM™, BTG, BTY, BTO).

NOTA



Consultar as instruções de utilização do Matrix Standard BT5 multi para a respetiva instalação. Estas estão disponíveis em www.biotype.de/en/ifus ou a pedido através de support@biotype.de pela BIOTYPE GmbH.

Depois da execução bem-sucedida do Matrix Standard BT5 multi, importar as definições fornecidas do instrumento para 3500 Genetic Analyzer conforme descrito em a [Tabela 7 \(www.biotype.de/en/template-files\)](#).

Tabela 7 Os ficheiros que são disponibilizados para Genetic Analyzers (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

As especificações para o protocolo do instrumento necessário estão descritas na . Só devem ser ajustados os parâmetros descritos; os restantes devem permanecer na predefinição. Seguir as instruções de utilização do fabricante para definir os parâmetros de corrida específicos.

Tabela 8 Parâmetros para os módulos de corrida dos diversos dispositivos de eletroforese em gel capilar

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

Diferindo dos valores indicados na Tabela 8, o tempo da corrida pode ser ajustado para garantir que todos os fragmentos (60-550 bp) de DNA Size Standard 550 (BTO) sejam analisados.

Para configurar um Size Standard protocol, têm de ser atribuídos os seguintes tamanhos para DNA Size Standard 550 (BTO) ao painel laranja:

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 e 550 bp.

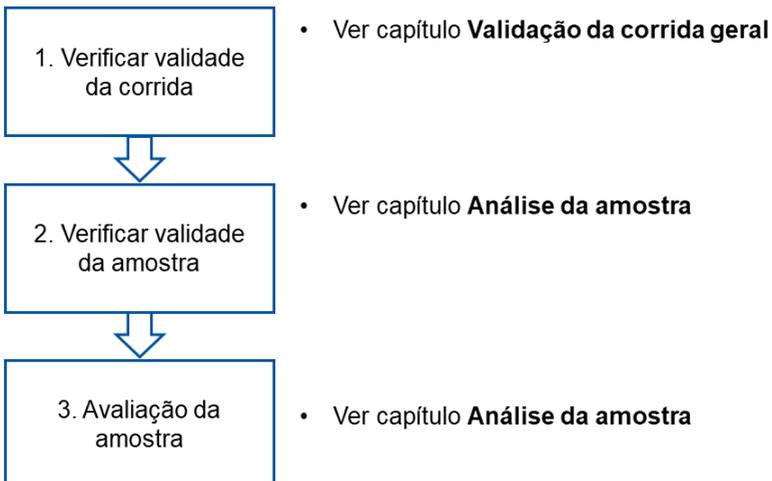
NOTA



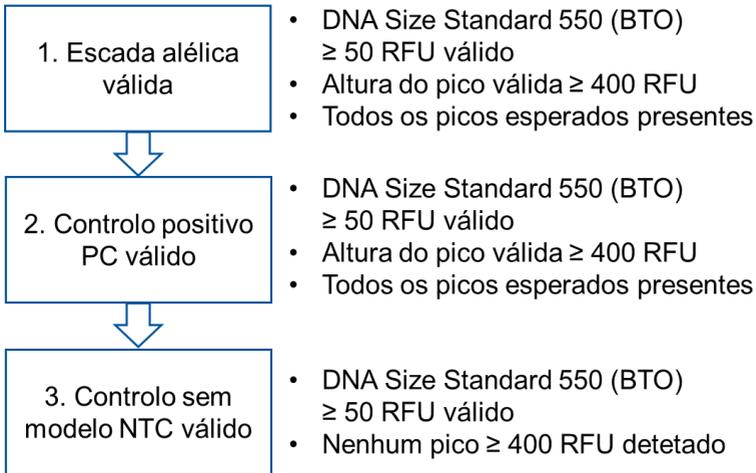
A BIOTYPE GmbH disponibiliza ficheiros modelo específicos para facilitar a instalação de determinadas definições de corrida para a análise do comprimento dos fragmentos, bem como ficheiros modelo de análise para uma configuração simples do software do GeneMapper™ ID-X. Estes ficheiros podem ser descarregados através de: www.biotype.de/en/template-files.

Análise de dados

Procedimento geral para a análise de dados



Validação geral da corrida



NOTA



Todo o intervalo de medição entre 50 bp e 560 bp deve ser analisado para avaliar a validade.

DNA Size Standard 550 (BTO)

Determinar os comprimentos de produtos amplificados exatos depende do tipo de dispositivo, das condições de eletroforese e do padrão de tamanho de ADN usado. Devido à complexidade de alguns alvos, a determinação do tamanho deve basear-se em referências uniformemente distribuídas.

Verificar o DNA Size Standard 550 (BTO) em todas as amostras quanto aos seguintes critérios:

- Presença de todos os fragmentos a: **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 e 550 bp** (ver [Figura 1](#))
- Todos os fragmentos estão presentes com **≥ 50 RFU**
- Coeficiente de determinação **R² > 0,995**
(ver Size Match Editor do GeneMapper ID-X)

- Os fragmentos não diminuem continuamente na altura do pico com o aumento do comprimento dos fragmentos.

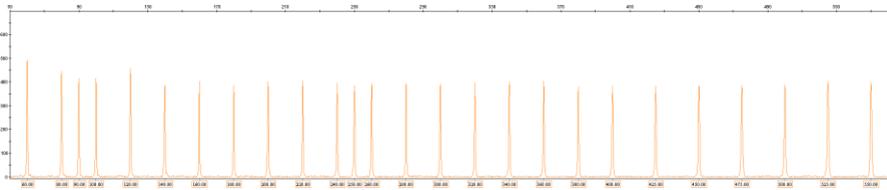


Figura 1 Eletroferograma do DNA Size Standard 550 (BTO), fragmentos com comprimentos em bp

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder

Depois de assegurar um padrão de tamanho válido, verificar se todos os picos na escada alélica estão presentes com ≥ 400 RFU.

NOTA



A Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder inclui um pico para cada alvo detetável. Comparar os alelos com o anexo [Figura 2](#).

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

Depois de assegurar um padrão de tamanho válido, verificar se todos os picos específicos para o PC estão presentes com ≥ 400 RFU.

O Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control, que faz parte do kit de teste, representa os seguintes alvos (ver [Tabela 9](#)).

Tabela 9 Picos de controlo no Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control

Panel	Pico do controlo
Azul	<ul style="list-style-type: none"> QS-Control BCR::ABL_b2a3 RUNX1::RUNX1T1 ABL-Control
Verde	<ul style="list-style-type: none"> KMT2A-PTD_e11e3
Amarelo	<ul style="list-style-type: none"> PML::RARA_bcr3

NOTA



O Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control inclui, pelo menos, um pico para cada painel usado. Comparar os alelos com o anexo [Figura 3](#).

No template control NTC

Depois de assegurar um padrão de tamanho válido, verificar se não são detetados picos ≥ 400 RFU no NTC (ver também o anexo [Figura 4](#)).

NOTA



Com a utilização do GeneMapper ID-X, juntamente com os ficheiros modelo fornecidos para o método de análise, os picos < 400 RFU em amostras do Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit são automaticamente não-atribuídos com o nome do alelo, para facilitar a avaliação do NTC.

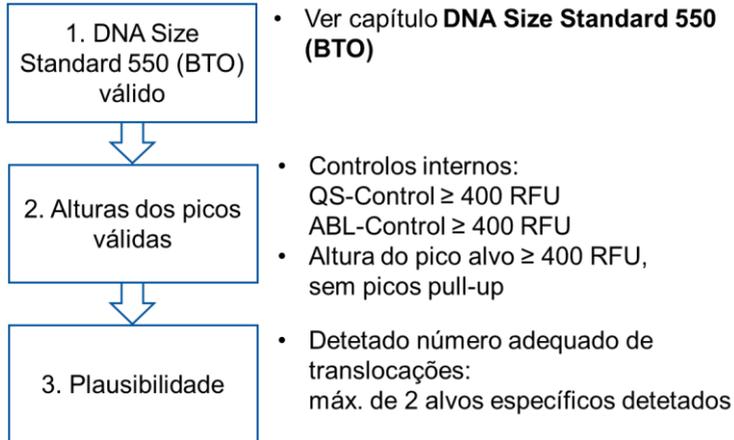
NOTA



Podem ocorrer no NTC, com maior proeminência, artefactos como pequenas manchas de corante. Devido à base ampla do pico, à forma anormal do pico e à não-atribuição do pico, é possível diferenciá-los dos picos de produtos amplificados.

Análise da amostra

Fluxo de trabalho da análise de dados



NOTA



Se várias deteções do alvo excederem o limiar ou se houver incertezas, consultar a secção de deteção e resolução de falhas (p. ex., para uma lista de combinações de sinal conhecidas) ou contactar a assistência técnica em support@biotype.de.

Usando o GeneMapper™ ID-X software juntamente com os modelos específicos fornecidos pela BIOTYPE GmbH, a validação básica é feita automaticamente.

Depois da verificação da validação da corrida e da amostra, os dados da amostra têm de ser avaliados.

NOTA

O Mentype® AMLplex^{QS} é um **teste exclusivamente qualitativo**. Esta aplicação não é adequada para a quantificação do número de cópias ou para a monitorização da doença residual mínima (DRM).

Ao usar os modelos de avaliação da BIOTYPE GmbH e uma avaliação bem-sucedida da escada alélica da corrida, é automaticamente atribuído um nome aos fragmentos da PCR detetados. Pode ser encontrada uma visão geral dos comprimentos dos fragmentos dos produtos PCR na seguinte Tabela 10.

Tabela 10 Visão geral dos comprimentos dos fragmentos das translocações na Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder no polímero POP-4™. ‡ Dois produtos amplificados para a variante KMT2A::MLLT3_6A; * Não obstante esta variante ser detetável com Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit, o comprimento variável do produto amplificado (aprox. 173 bp) impede a alocação automatizada

Panel/Translocação	Comprimento [bp]	Panel/Translocação	Comprimento [bp]
FAM Panel (canal azul)		BTG Panel (canal verde)	
CBFB::MYH11_TypeG	63	DEK::NUP214	78
CBFB::MYH11_TypeI	66	KMT2A-PTD_e9e3	87
QS-Control	72	KMT2A::MLLT3_6A_S‡	113
BCR::ABL_b2a3	107	KMT2A::MLLT3_6B	190
CBFB::MYH11_TypeJ	141	KMT2A-PTD_e10e3	217
CBFB::MYH11_TypeC	146	KMT2A::ELL_e10e3	241
CBFB::MYH11_TypeD	160	KMT2A::MLLT3_7A	245
CBFB::MYH11_TypeH	165	KMT2A::ELL_e10e2	289
CBFB::MYH11_TypeF	175	KMT2A::MLLT4	303
BCR::ABL_b3a3	183	KMT2A-PTD_e11e3	332
BCR::ABL_e1a3	206	KMT2A::MLLT3_8A	359
MLLT10_240::PICALM_2092	265	KMT2A::MLLT3_6A_L‡	497
CBFB::MYH11_TypeA	271	BTY Panel (canal amarelo)	

Panel/Translocação	Comprimento [bp]	Panel/Translocação	Comprimento [bp]
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		

Análise de dados com GeneMapper™ ID-X

Preparação do GeneMapper™ ID-X software

Para instruções gerais sobre a aplicação e a análise da amostra com este software, consultar o manual do utilizador do GeneMapper™ ID-X Software.

A alocação dos alelos será feita com o software de análise GeneMapper™ ID-X juntamente com os ficheiros modelo Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit da BIOTYPE GmbH. Os ficheiros modelo BIOTYPE (ver Tabela 11) podem ser descarregados do nosso site (www.biotype.de/en/template-files) ou ser pedidos através do e-mail support@biotype.de. O fluxo de trabalho da análise usando o GeneMapper™ ID-X software é mostrado na Tabela 12.

Tabela 11 Modelos da BIOTYPE GmbH para o GeneMapper™ ID-X Software, modelos específicos para ¹POP-1™, ²POP-4™ and ³POP-7™ polymer

Modelo	Nome do modelo	
Panels*	AMLplexIVD_Panel1_v1x ¹ AMLplexIVD_Panel4_v1x ² AMLplexIVD_Panel7_v1x ³	ou versões superiores
BinSets*	AMLplexIVD_Bins1_v1x ¹ AMLplexIVD_Bins4_v1x ² AMLplexIVD_Bins7_v1x ³	ou versões superiores
Size Standard*	BTO_60-550_v1x	ou versões superiores
Analysis Method*	AMLplexIVD_Analysis1_v1x ¹ AMLplexIVD_Analysis4_v1x ² AMLplexIVD_Analysis7_v1x ³	ou versões superiores
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 Alleles Table for 10 Alleles	

*Estes modelos têm de ser sempre usados para a análise de dados. Os restantes ficheiros modelo são opcionais.

NOTA



A importação e o acesso aos alelos com os ficheiros modelo fornecidos só estão garantidos se for usado o GeneMapper™ ID-X software. Ao aplicar o GeneMapper™ software, poderá haver problemas na importação de alguns ficheiros modelo. Poderá se necessário ajustar Panels e Bins com uma ou mais corridas da escada alélica nas configurações específicas do instrumento. Contacte-nos para assistência (support@biotype.de).

Tabela 12 Fluxo da análise de dados com o GeneMapper™ ID-X

N.º	Ícone	Etapa de trabalho										
1		<p>Preparação do software</p> <p>Panel Manager Importar os ficheiros modelo fornecidos para Panels e Bins</p> <p>GeneMapper™ ID-X Manager Importar o modelo fornecido para Analysis Method e Size Standard</p>										
2		<p>Importação da amostra</p> <p>Add Samples to Project - navegar para a pasta da corrida, seleccionar e Add to List → Add</p>										
3		<p>Análise da amostra</p> <p>Seleccionar as seguintes propriedades nas colunas adequadas da folha da amostra e escolher Analyze.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Nome da coluna</th> <th>Seleccionar</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sample Type</td> <td>Escada alélica, controlo positivo, controlo negativo ou amostra</td> </tr> <tr> <td>Analysis Method</td> <td>Seleccionar o modelo BIOTYPE AMLplexIVD_Analysis_v1x previamente importado</td> </tr> <tr> <td>Panel</td> <td>Seleccionar o modelo BIOTYPE BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x previamente importado</td> </tr> <tr> <td>Padrão de tamanho</td> <td>Seleccionar o modelo BIOTYPE BIOTYPE template BTO_60-550_v1x previamente importado</td> </tr> </tbody> </table>	Nome da coluna	Seleccionar	Sample Type	Escada alélica, controlo positivo, controlo negativo ou amostra	Analysis Method	Seleccionar o modelo BIOTYPE AMLplexIVD_Analysis_v1x previamente importado	Panel	Seleccionar o modelo BIOTYPE BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x previamente importado	Padrão de tamanho	Seleccionar o modelo BIOTYPE BIOTYPE template BTO_60-550_v1x previamente importado
Nome da coluna	Seleccionar											
Sample Type	Escada alélica, controlo positivo, controlo negativo ou amostra											
Analysis Method	Seleccionar o modelo BIOTYPE AMLplexIVD_Analysis_v1x previamente importado											
Panel	Seleccionar o modelo BIOTYPE BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x previamente importado											
Padrão de tamanho	Seleccionar o modelo BIOTYPE BIOTYPE template BTO_60-550_v1x previamente importado											
4		<p>Verificação de controlos</p> <p>Verificar a validade do controlo (escada alélica, controlo positivo, controlo negativo)</p> <p>Com alturas de pico suficientes, a atribuição é feita de acordo com as especificações no Analysis Method</p>										
5		<p>Avaliação da amostra</p> <p>Verificar validade da amostra.</p> <p>Com alturas de pico suficientes, a atribuição é feita de acordo com as especificações no Analysis Method</p>										

NOTA**i**

Usando os ficheiros modelo fornecidos para Analysis Method, Bins, Panels e selecionando o tipo de amostra correspondente, a validade destas amostras é verificada automaticamente pelo software. Os sinalizadores do controlo da qualidade SOS (Sample off-Scale), SQ (Sizing Quality), OMR (Outside Marker Range) serão caixas verdes se a validade se confirmar.

ARNM	SOS	SQ	SSPK	MIX	OMR	CGQ
						

NOTA**i**

Usar o Size Match Editor no GeneMapper™ ID-X para avaliar o padrão de tamanho. Se o acesso automático a um fragmento falhar, os tripletos 80/90/100 bp e 240/250/260 bp podem ser usados para orientação na atribuição manual de picos.

Deteção e resolução de falhas

Para uma deteção de alvos exata e fiável, a análise pós-PCR, incluindo a atribuição e a validação automáticas de alvos, deve ser feita com o GeneMapper ID-X software, validado em combinação com os ficheiros modelo da BIOTYPE. Em caso de incertezas, usar o e-mail de contacto support@biotype.de.

Picos pull-up

Podem ocorrer picos pull-up se as alturas de pico estiverem fora do intervalo de deteção linear ou se tiver sido aplicada uma matriz incorreta. Surgem nas posições de picos específicos em canais de outra cor, tipicamente com intensidades de sinal mais baixas. Este efeito deve ser tido em conta nos casos de perfis de amplificação elevados dos seguintes alvos:

- PML::RARA_bcr3 (canal amarelo) provoca um pico pull-up em KMT2A::ELL_e10e2 (canal verde)
- RUNX1::RUNX1T1 (canal azul) provoca um pico pull-up em KMT2A::MLLT4 (canal verde, apenas se tiver sido usado POP-7™ Polymer)

Adição de nucleótidos independente da amostra

Devido à sua atividade de transferase terminal, a Multi Taq 2 DNA Polymerase tende a adicionar um radical de adenosina na extremidade 3' dos fragmentos de ADN amplificado. O pico do artefacto é uma base mais curta do que o esperado (picos -1 bp). Todos os primersprimers BIOTYPE foram concebidos para minimizar estes artefactos. A formação de artefactos é, para além disso, reduzida pelo prolongamento opcional do passo de extensão final do protocolo PCR a 68 °C durante 60 min. A altura do pico do artefacto está correlacionada com a quantidade de cADN. Cabe aos laboratórios definir os respetivos limites individuais para a análise dos picos.

Artefactos

A temperatura ambiente pode influenciar o desempenho dos produtos PCR em instrumentos multicapilares, ocorrendo ombros nos picos ou picos divididos. Além disso, a atribuição automatizada poderá ser influenciada em alguns casos. Se estes efeitos ocorrerem, recomendamos que a amostra volte a ser injetada a uma temperatura ambiente mais elevada. Considerar sempre a utilização de consumíveis frescos de acordo com as recomendações do fabricante.

Influência dos polímeros

O Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit foi validado e certificado para a análise no POP-4™ polymer. A utilização de outros polímeros (como POP-7™ ou POP-1™) foi verificada, mas pode influenciar o comportamento da corrida de determinados produtos PCR. Além disso, o ruído de fundo pode aumentar devido ao comportamento diferente dos corantes fluorescentes livres.

Desvios de pipetagem

A análise de robustez do Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit mostrou que o kit resiste a desvios pouco significativos do protocolo descrito (desvio de +/- 10 %). Um desvio médio (+/- 20 %) do protocolo experimental descrito pode ser mais crítico para a análise. É essencial prestar atenção aos desvios médios de -20 % em componentes PCR, dado reduzirem significativamente a altura do sinal. Os alvos mais sensíveis neste contexto são KMT2A::MLLT4 e DEK::NUP214.

Para minimizar eventuais desvios, recomendamos a utilização de pipetas calibradas, uma pipetagem precisa e que se misture bem.

Picos de controlo de ABL baixos

O controlo interno de ABL forma o produto amplificado mais longo do Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit, sendo assim um marcador de controlo da qualidade essencial. No caso de uma altura de pico de ABL-control baixa, o mais provável é uma das seguintes causas:

Quantidade de amostra usada na reacção é demasiado baixa: determinar a concentração de ARN e aumentar a quantidade de cADN sintetizado, conforme necessário.

O ARN fragmentado, ou seja, produtos amplificados dos alvos mais curtos, pode ser positivo, mas faltar o controlo interno de ABL. Verificar o fluxo de trabalho da preparação da amostra quanto a contaminação da ARNse. Sabe-se que a fragmentação do ARN ocorre em materiais de amostra arquivados.

Síntese de cADN ineficaz: observar as instruções do fabricante durante a síntese do cADN. Usar um dos kits de síntese de cADN validados conforme descrito no capítulo [Transcrição para o c](#).

A amostra fica comprometida com transcriptase reversa ativa: observar as instruções do fabricante, especialmente no que diz respeito à etapa de inativação por calor durante a síntese de cADN.

Produtos amplificados adicionais ou duplos positivos

Espera-se que a maioria das amostras dos doentes mostre um resultado negativo ou positivo para uma translocação. Mais de uma translocação representa um resultado pouco comum e exige uma verificação mais aprofundada. No entanto, foram observadas algumas combinações em amostras dos doentes de antemão, como se segue:

O BCR::ABL_b2a3 alvo pode aparecer com uma altura de pico relativamente baixa se houver uma amplificação forte para o ABL-control ou qualquer outra variante de transcrição do BCR::ABL (cerca de 5-10 % do resultado do alvo principal).

Sabe-se que o KMT2A partial tandem domain (KMT2A-PTD) ocorre em simultâneo com outras translocações e em reorganizações complexas que podem aparentar ser positivas para mais de uma variante de KMT2A-PTD.

Ao usar o POP7TM-Polymer, a translocação CBFB::MYH11_Type A pode causar um sinal não-específico para RUNX1::RUNX1T1 e CBFB::MYH11 Type F. O pico RUNX1::RUNX1T1 é atribuído como fora da escada ao ser usado o polímero POP4, podendo ser verificado usando a linha celular ME-1. Ambos os picos laterais não-específicos mostram uma altura de pico RFU inferior em comparação com CBFB::MYH11_Type A. Ao usar o POP7TM-Polymer, pode ser atribuído um pico não-específico fora da escada como translocação CBFB::MYH11_Type I com alturas de pico inferiores a 2000 RFU.

O KMT2A::MLLT4 alvo ocorre com dois produtos amplificados com comprimentos diferentes, dependendo da prevalência específica da amostra das variantes de transcrição. A maioria das amostras dos doentes mostram ambos os produtos amplificados com uma diferença de comprimento de três nucleótidos sob a forma de pico duplo no intervalo do alvo KMT2A::MLLT4. Este é um resultado válido, dispensando medidas corretivas.

Pode ocorrer uma translocação do KMT2A com limite no exão 9 (o mais comum) ou nos exões 10 e 11 (raramente). Qualquer pico forte fora da

escada no canal verde pode derivar de uma translocação do KMT2A, podendo ser verificado por outros métodos.

A variante 6A da transcrição do alvo KMT2A::MLLT3 pode produzir dois produtos amplificados detetáveis, em casos de utilização de ARN em elevada quantidade e de elevada qualidade, sendo os picos correspondentes 6A_S (short, obrigatório) e 6A_L (long, opcional). Este é um fenómeno necessário inerente ao design dos primers do Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit. Este é um resultado válido, dispensando medidas corretivas.

O mais provável é que um pico fora da escada no canal amarelo entre os intervalos do PML::RARA_bcr1 e do bcr3 seja causado por uma variante do PML::RARA_bcr2. Este alvo tem diversos limites no exão 6 do PML, não podendo por isso ser atribuído a um intervalo específico.

Avaliação do desempenho

Sensibilidade analítica

O tipo de amostra para Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit é definido como ARN celular isolado de sangue total venoso periférico ou de aspirado de medula óssea, transcrito para cADN. ARN de espécimes de sangue é mensurável num intervalo entre 50 ng e 1000 ng, com uma altura de pico suficiente do controlo ABL usando cDNA synthesis kits SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) e High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) validados durante esta avaliação do desempenho. Partindo do princípio de que a eficiência da transcrição é de 100 %, isso resulta num intervalo de concentração de cADN entre 2,5 ng/μL e 50 ng/μL; é usado 1 μL de cADN na reação PCR. Para a amostras de medula óssea, é mensurável ARN no intervalo entre 50 ng e 1000 ng usando o SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) e entre 100 ng e 1000 ng usando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) com uma altura de pico suficiente do controlo ABL. Partindo do princípio de que a eficiência da transcrição é de 100 %, isso resulta num intervalo de concentração de cADN entre 2,5 ng/μL ou 5 ng/μL e 50 ng/μL; é usado 1 μL de cADN na reação PCR. Idealmente, a quantidade introduzida de ARN é definida como 1000 ng para uma amostra de sangue total periférico e 500 ng para uma amostra de medula óssea. No caso de amostras com pouca concentração de ARN ou alvos críticos, pode-se aumentar até 4 μL o volume de cADN a inserir no PCR, transcrito com o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) independentemente do tipo de amostra. Para o cADN transcrito com o SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific), o volume de do cADN é limitado a um máximo de 2 μL.

O Limit of Blank (LoB) foi testado em 12 amostras de origem diferente com uma quantidade previamente definida como ideal I. Dado não terem sido detetados picos não-específicos acima do limiar de altura de pico de

400 RFU no intervalo entre 55 bp e 550 bp em nenhuma das 12 amostras testadas, um limite de 400 RFU pode ser definido.

O Limit of Detection (LoD) do Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit foi testado com 6 amostras artificiais com fundo de cADN, abrangendo todos os pares de primers na mistura de primers, com pares de primers que detectam mais de um alvo a amplificar a variante de transcrição alvo mais longa, e por isso a mais difícil de detetar.

O Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit mostrou um limite de deteção aceitável de acordo com os critérios de aceitação com um LoD máximo de 400 cópias para os alvos testados (ver Tabela 13), exceto para o KMT2A::MLLT4, que continuou a mostrar um resultado aceitável com um LoD de 1000 cópias. Uma vez que nem todas as variantes de transcrição das fusões genéticas detetáveis puderam ser testadas, parte-se do princípio de que possa ser aplicado com segurança um total de LoD de 1000 cópias, que foi o resultado mais alto dos alvos testados.

Tabela 13 LoD para o Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit.

Amostra	Alvo	LoD [cópias]
Amostra 1	CBFB::MYH11_TypeJ	200
	BCR::ABL_e1a2	200
	CBFB::MYH11_TypeB	200
	KMT2A-PTD_e11e3	200
	PML::RARA_bcr1	400
Amostra 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
Amostra 3	CBFB::MYH11_TypeG	200
	BCR::ABL_b2a3	100
	CBFB::MYH11_TypeE	200
	KMT2A::ELL_e10e3	100

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

Dado que o Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit é um ensaio qualitativo concebido para determinar a presença ou a ausência do analito alvo, não se considera relevante testar o Limit of Quantitation (LoQ) para a utilização prevista.

Especificidade analítica

Testámos o acesso automático ao alelo com a escada alélica e a concordância da atribuição do alelo em comparação com as amostras artificiais dos alvos de translocação usando o GeneMapper™ ID-X software. Com base nos resultados, são determinadas as definições do dispositivo específicas do teste para a genotipagem através de eletroforese em gel capilar (bins e panels) do Genetic Analyzer.

Os primers PCR foram concebidos para se ligar complementarmente à sequência de ADN de referência oficial do genoma humano. Variantes genéticas, como Single Nucleotide Polymorphism (SNPs, INDELS ou eliminações), podem afetar determinadas ligações de primers, tendo sido avaliadas por entradas do dbSNP relevantes para o Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit. Uma entrada (rs73504425) resulta na perda da função do primer. O alelo da variante ocorre em 0,6 % da população africana e localiza-se no local de ligação do primer para PICALM::MLLT10, uma fusão genética raramente comunicada com uma prevalência <1 %.

Além disso, foi pesquisado um BLAST no transcrito humano para a Mentype® AMLplex^{QS} Primer mix, resultando em produtos de amplificação não-específicos no intervalo entre 0 – 600 bp.

Exatidão e veracidade

A exatidão analítica do Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit baseia-se nos resultados de estudos de veracidade do kit. A BIOTYPE GmbH participa ativamente num programa de External Quality Assessment (EQA) desde 2013. A presença ou a ausência de uma translocação dentro das amostras é determinada a partir do consenso dos resultados de todos os participantes desta EQA. No total, foram analisadas 68 amostras desde 2013.

Com base nestes resultados, foi criada uma matriz de contingência com base na comparação dos resultados do Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit (positivos/negativos) e os resultados verdadeiros (positivos/negativos) confirmados pelo consenso de todos os participantes do External Quality Assessment program. De acordo com a CLSI EP12 (3.ª edição) a métrica do desempenho fundamental mostrado na Tabela 14 foi calculada com base na matriz de contingência.

Tabela 14 Características analíticas do Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit.

Características analíticas	Estimativa	Intervalo de confiança inferior a 95%	Intervalo de confiança superior a 95%
Sensibilidade analítica	92,2 %	81,5 %	96,9 %
Especificidade analítica	94,1 %	73,0 %	99,0 %
Valor positivo preditivo	97,9 %	89,1 %	99,6 %
Valor negativo preditivo	80,0 %	58,4 %	91,9 %
Exatidão	92,6 %	83,9 %	96,8 %

Estes cálculos permitem uma medição abrangente da capacidade de o Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit classificar corretamente casos positivos e negativos com uma probabilidade de 92 % e 94 %, respetivamente. A proporção total de resultados corretos é de 93 %, mostrando uma elevada fiabilidade. O Mentype® AMLplex^{QS} PCR

Amplification Kit demonstra um elevado desempenho analítico, validando a eficácia e a fiabilidade do ensaio.

Precisão

Avaliámos a repetibilidade e a reprodutibilidade do ensaio com base na ISO 5725-2:2022-05 e na CLSI EP05 (3.^a edição). Foram avaliadas cinco amostras artificiais e o Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control num estudo multilocal de 5 x 5 x 3 (dia x réplica x local). O estudo multilocal examina a fonte principal da variação (repetibilidade e a reprodutibilidade) devido aos diferentes locais testados, que irão apresentar a medição de diferentes operadores em diferentes locais com diferentes instrumentos. A repetibilidade resultante variou entre 8,3 % de CV e 15,6 % de CV, e a reprodutibilidade variou entre 14,6 % de CV e 30,5 % de CV. No total, o Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit mostra uma precisão aceitável com $SD_{Rep} \leq 2500$ RFU para todas as fusões genéticas específicas testadas com as amostras artificiais 1 a 5 e para o Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control.

Limiar do teste

O Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit usa a deteção qualitativa das fusões genéticas por critério de avaliação PCR. Desta forma, um dos limiares relevantes para o ensaio é a altura de pico mínima para uma distinção segura entre o ruído de fundo técnico e a deteção genuína do alvo. O limiar da altura de pico RFU foi determinado a 400 RFU com dados do teste de sensibilidade analítica.

Interferentes e reações cruzadas

Foram avaliados potenciais interferentes, que poderiam influenciar os resultados do procedimento de medição, de acordo com as recomendações das diretrizes CLSI EP07 (3.^a edição) e EP37 (1.^a edição). Para o Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit, foram determinados os interferentes endógenos e exógenos, a respetiva concentração máxima esperada ($C_{m\acute{a}x}$) na reação PCR foi testada, como sugerido nas diretrizes, e no caso de se observar interferência, foram testadas outras concentrações para determinar a concentração à qual nenhuma interferência é detetável.

Os resultados mostraram não haver efeito de interferência do ADN endógeno interferente testado a 1 ng na reação PCR, quando a digestão do ADN foi realizada como parte do processamento da amostra.

Relativamente ao sangue endógeno interferente, observou-se um efeito interferente no $C_{m\acute{a}x}$ calculado de 0,87 % v/v na reação PCR, tendo sido testadas outras diluições até deixar de ser detetada interferência. 0,087 % v/v de sangue mostrou não haver interferência. No entanto, a contaminação do sangue pode ser vista na reação PCR ou na suspensão de ARN isolado pela mudança para a cor laranja. Se a cor mudar, recomendaríamos a repetição do isolamento do ARN para evitar potenciais interferências.

Para os interferentes exógenos DTT, inibidor da RNase, DNase, etanol, metoclopramida, EDTA, hidroxíureia e citrato, não foram observados efeitos de interferência nos respetivos $C_{m\acute{a}x}$, tendo sido observado que os desvios do grupo não-tratado para as amostras testadas estavam dentro dos limites aceites.

Relativamente aos interferentes exógenos transcriptase reversa, heparina e proteinase K, foi observada interferência no respetivo $C_{m\acute{a}x}$ calculado ou recomendado pela CLSI EP37 (1.^a edição), tendo sido testadas outras diluições até deixar de ser detetada interferência. Para a enzima transcriptase reversa, o $C_{m\acute{a}x}$ 0,2 % v/v testado mostrou interferência se a enzima não fosse inativada por calor de acordo com as instruções dos fabricantes dos kits de síntese do cADN testado. A heparina 3,3 U/dL e a enzima proteinase K 0,0001 % v/v não mostraram interferência.

Os anticoagulantes do sangue EDTA, citrato de sódio e heparina foram adicionalmente testados com os kits de isolamento recomendados. Não foi detetado impacto no desempenho analítico. Antecipamos que o fluxo de trabalho dos kits de isolamento irá remover eficazmente qualquer substância interferente testada derivada de anticoagulantes e de reagentes de isolamento do ARN.

Tabela 15 Concentrações não-interferentes testadas de interferentes endógenos e exógenos.

Tipo de interferente	Categoria	Interferente	Concentração não-interferente testada
Endógeno	Componentes de sangue total	Sangue total	0,087 % v/v em reação PCR
Exógeno	Anticoagulantes	EDTA	0,099 mg/dL
		Citrato	0,004 % v/v em reação PCR
		Heparina	3,3 U/dL
	Reagentes de isolamento do ARN	Proteinase K	0,0001 % v/v em reação PCR
		Etanol	0,3 % v/v em reação PCR
		DNase	0,16 % v/v em reação PCR
	Reagentes de transcrição reversa para o cADN	DTT	0,2 % v/v em reação PCR
		Inibidor da RNase	0,2 % v/v em reação PCR
		Transcriptase reversa	0,2 % v/v em reação PCR (inativada por calor)
	Agente antiemético	Metoclopramida	0,225 mg/dL
Agente antineoplásico	Hidroxiureia	3,08 mg/dL	

Estabilidade durante a utilização

Todos os estudos de estabilidade foram planeados em conformidade com a ISO 23640:2015 e a diretriz CLSI EP25-(2.^a edição). Foi realizado o seguinte procedimento para todos os estudos de estabilidade: o Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit foi testado em vários momentos com diversas durações. Foram analisadas amostras artificiais e o Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control. A avaliação final das várias condições incluiu a comparação entre as médias do momento inicial (T_0) e os momentos subsequentes (T_n), tendo sido calculada com a seguinte equação:

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

Para o estudo da estabilidade durante a utilização, foram feitas duas experiências. Uma para testar a estabilidade depois de vários ciclos de

congelamento e descongelamento e outra para testar a estabilidade dos kits durante a utilização simulada depois da abertura, como parte do estudo da estabilidade do congelamento e do descongelamento e durante a vida útil declarada.

Com base nos resultados, o Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit mantém a estabilidade durante até 20 ciclos de congelamento e descongelamento, podendo ser usado até 24 meses depois da abertura.

Dados de desempenho clínico

Conceção do estudo, ética e aspetos regulamentares

O Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit e os métodos de referência foram testados em 297 amostras dos doentes e em 10 voluntários saudáveis. A finalidade deste estudo era mostrar evidência clínica de acordo com os artigos §§20 a 24 da lei alemã relativa a dispositivos médicos "Medizinproduktgesetz". Usando os métodos de referência citogenética (FISH) e/ou qPCR monoplexada de validação interna, ficou comprovada uma concordância com o dispositivo. A confirmação da comissão ética responsável foi recebida no dia 06/06/2012.

Métodos de referência

O alvo principal é a determinação da sensibilidade e da especificidade diagnósticas em comparação com os métodos de referência. Enquanto método de referência, a Fluorescence-In-Situ-Hybridization (FISH) padronizada foi realizada para uma seleção de translocações [Grimwade et al. Blood 116: 354-65, 2010]. As translocações não-tratáveis com citogenética foram testadas com testes monoplex-nested-PCR estabelecidos e validados no laboratório de testes [Stuedel et al. Genes Chromosomes Cancer 37: 237-51, 2003, van Dongen et al. Leukemia 13: 1901-28, 1999].

Extração e purificação do ARN

Foram colhidas células mononucleares (MNC) de amostras com centrifugação do gradiente de densidade. Procedeu-se a seguir ao isolamento de ARN total e à transcrição reversa para o cADN recorrendo a

kits existentes no mercado. A qualidade do cADN foi analisada através de PCR em tempo real. Os ensaios de PCR individuais validados serviram para confirmar os genes da fusão e as mutações.

Resultados

O Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit não apresentou resultados falsos positivos com o cADN testado dos 10 voluntários saudáveis.

Das 297 amostras dos pacientes testadas, não foi possível avaliar 5 devido à deteção de controlo interno de ABL abaixo do limiar recomendado. Das 292 amostras restantes, 201 mostraram resultados verdadeiros negativos em comparação com os métodos de referência.

Os resultados individuais dos testes de comparação estão resumidos na Tabela 16. Não foi possível avaliar as fusões genéticas PICALM::MLLT10 (CALM-AF10) e KMT2A::MLLT4 (MLL-AF6) relativamente à sensibilidade diagnóstica, dado não estarem disponíveis amostras pré-caracterizadas positivas.

No total, conseguiram-se uma sensibilidade diagnóstica de 94 % e uma especificidade diagnóstica de 99,5 %.

Tabela 16 Conclusão dos resultados dos dados do desempenho clínico do Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit. *Dados de prevalência citados de Grimwade et al. 2010. n.a. = não avaliado

Biomarcador			Avaliação do desempenho clínico (n=292)						
Fusão genética	Aberração crom.	Variante	Prev* [%]	Verdadeiro positivo	Verdadeiro negativo	Falso positivo	Falso negativo	Sensibilidade diagnóstica [%]	Especificidade diagnóstica [%]
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 e1a2 b3a2 b3a3 b2a2 b2a3	1	1	291	0	0	100,0	100,0
PICALM::MLLT10	t(10;11)(p13;q14)	MLLT10_240-PICALM_1987 MLLT10_240-PICALM_2092	1	0	292	0	0	n.a.	100,0
CBFB::MYH11	inv(16)(p13;q22)	Type A Type B	5	28	262	0	2	93,3	100,0

Biomarcador	Avaliação do desempenho clínico (n=292)									
	Fusão genética	Aberração crom.	Variante	Prev* [%]	Verdadeiro positivo	Verdadeiro negativo	Falso positivo	Falso negativo	Sensibilidade diagnóstica [%]	Especificidade diagnóstica [%]
		Type C								
		Type D								
		Type E								
		Type F								
		Type G								
		Type H								
		Type J								
DEK::NUP214	t(6;9)(p23;q34)	n. b.	1	3	289	0	0	100,0	100,0	
KMT2A::MLLT4	t(6;11)(q27;q23)	n. b.	<0,5	0	292	0	0	n.a.	100,0	
KMT2A::MLLT3	t(9;11)(p22;q23)	6A (6A_S; 6A_L) 7A 8A 6B	1	4	287	0	1	80,0	100,0	
KMT2A::ELL	t(11;19)(q23;p13.1)	e10e2 e10e3	1	0	290	1	1	0,0	99,7	
KMT2A-PTD	Parcial	e9e3	5-7	23	269	0	0	100,0	100,0	
	Tandem	e10e3								
	Duplicação	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 bcr2 bcr3	13	8	284	0	0	100,0	100,0	
Resumo			37	85	201	1	5	94,4	99,5	

Avaliação diagnóstica

As características de desempenho clínico do Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit mostraram resultados aceitáveis. Os parâmetros de avaliação do desempenho clínico foram calculados de acordo com o anexo I, secção 9.1b do RDIV (UE) 2017/746, conforme mostrado na Tabela 17.

Tabela 17 Características diagnósticas do Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit

Característica diagnóstica	Estimativa	Intervalo de confiança inferior	Intervalo de confiança superior
Sensibilidade diagnóstica	94,4 %	87,7 %	97,6 %
Especificidade diagnóstica	99,5 %	97,3 %	99,9 %
Valor preditivo positivo	98,8 %	93,7 %	99,8 %
Valor preditivo negativo	97,6 %	94,4 %	99,0 %
Exatidão diagnóstica	98,0 %	95,6 %	99,1 %

Controlo da qualidade

Todos os componentes do kit são sujeitos a um processo intensivo de garantia da qualidade na BIOTYPE GmbH. A qualidade dos kits de teste é permanentemente monitorizada para garantir a usabilidade sem restrições. Contacte-nos se tiver questões relativas à garantia da qualidade.

Assistência técnica

Para aconselhamento técnico, contacte a nossa equipa de apoio ao cliente:

e-mail: support@biotype.de

telefone: +49 (0)351 8838 400

Referências

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.

Limitações da utilização

- Os procedimentos neste manual têm de ser seguidos conforme descrito. Qualquer desvio pode resultar numa falha do ensaio ou causar resultados erróneos.
- A utilização deste produto está limitada a utilizadores profissionais de laboratório com formação especial em técnicas de PCR e eletroforese em gel capilar.
- São necessários procedimentos adequados de colheita, transporte, armazenamento e processamento para o melhor desempenho deste teste.
- Este ensaio não pode ser usado diretamente na amostra. Têm de ser usados métodos de extração do ácido nucleico antes da utilização deste ensaio.
- A utilização do kit só foi validada com os reagentes, os instrumentos e o software descritos no capítulo Material e dispositivos necessários, mas não fornecidos.
- O Mentype® AMLplex^{QS} foi concebido, validado e certificado com ferramenta de rastreio para a classificação do subtipo de LMA. Esta aplicação não é adequada para quantificar os números de cópia como

a monitorização da Minimal Residual Disease (MRD) nem para validar outros subtipos de leucemias ou LMA pediátrica.

- Devido à variabilidade genética, o single nucleotide polymorphism (SNPs) ou o insertion deletion polymorphism (INDELS) curto pode afetar a eficácia do primer ou a acessibilidade do modelo. Uma análise da versão mais recente do conjunto do genoma humano (HG38) para todos os grupos étnicos encontrou apenas um SNP crítico que resultou na perda de função do primer. O alelo da variante ocorre em 0,6 % da população africana e localiza-se no local de ligação do primer para PICALM::MLLT10, uma fusão genética raramente comunicada com uma prevalência <1 %. No entanto, devido à baixa prevalência de fusão genética em combinação com a reduzida probabilidade de ocorrência do SNP na população mundial, o risco de resultados falsos negativos é baixo. Em caso de incerteza, considerar a confirmação dos resultados através de métodos de referência.
- As boas práticas laboratoriais são essenciais para assegurar o desempenho do kit.
- Os resultados têm de ser interpretados por um profissional de saúde com a devida formação.
- Para a interpretação dos resultados tem de ser tida em conta a possibilidade de resultados falsos negativos e falsos positivos.
- Não usar componentes expirados ou mal conservados

Informações para encomendas

As encomendas devem ser feitas para o e-mail sales@biotype.de.

Produto	Tamanho da embalagem	Número de encomenda
Mentype® AMLplex ^{QS} PCR Amplification Kit	25 reações	45-12100-0025
	100 reações	45-12100-0100
	400 reações	45-12100-0400
Matrix Standard BT5 multi	1 x 25 µL	45-15100-0025
	2 x 25 µL	45-15100-0050

Marcas comerciais e exonerações de responsabilidade

Mentype® é uma marca comercial registada da BIOTYPE GmbH.

Outras marcas comerciais: ABI PRISM®, GeneMapper®, SuperScript™, GeneAmp® e Applied Biosystems® (Applied Biosystems LLC group); QIAamp® (Qiagen); POP-4™, POP-1™, POP-7™ (Europa: Applied Biosystems LLC, USA: Life Technologies Corporation). A PCR está abrangida por patentes. Os titulares de patentes são a Hoffmann-La Roche Inc. e a F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Os nomes registados, as marcas comerciais, etc. usados neste documento, mesmo que não estejam especificamente assinalados como tal, não podem ser considerados como não estando protegidos por lei.

O Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit é um kit de diagnóstico com marcação CE em conformidade com o regulamento europeu relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro (UE) 2017/746.

Produto não licenciado com a Health Canada e não autorizado ou aprovado pela FDA.

Não disponível em todos os países.

© 2025 BIOTYPE GmbH; todos os direitos reservados.

Explicação dos símbolos



Fabricante



Código do lote



Contém reagentes suficientes para <N> testes



Consultar as instruções de utilização eletrónicas (eIFU)



Prazo de validade



Limite de temperatura



Referência



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



Conservar ao abrigo da luz solar



Conservar em local seco



Unique device identifier

Outras marcações usadas nestas instruções de utilização:



Dicas úteis



Atenção, observar este aviso!

texto sublinhado a azul

Links que remetem para conteúdo externo, como sites e endereços de e-mail

texto sublinhado a preto

Ligações cruzadas no documento para facilitar a navegação

travessões, itálico, negrito

Campos para clicar num software

Anexo

Lista de genes-alvo

Gene	Nomes alternativos	ID da transcrição
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

Eletoferogramas de amostras de referência

As páginas que se seguem contêm exemplos de eletroferogramas da Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder ([Figura 2](#)), do Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control (PC, [Figura 3](#)) de um controlo negativo sem ADN (NTC, [Figura 4](#)).

Todas as amostras foram amplificadas num termociclador ProFlex PCR e analisadas num 3500 Genetic Analyzer (POP-4, matriz de 36 cm) utilizando o parâmetro de corrida validado. A análise de dados foi realizada usando o GeneMapper ID-X, versão 1.6. Foram aplicados Bins, Panels e Analysis method de acordo com a [Tabela 10](#).

Os eletroferogramas são ampliados para um comprimento de fragmento de 50 – 560 bp (eixo x). O escalonamento do eixo y foi feito individualmente:

[Figura 2](#), página [58](#): Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder: 3000 RFU

[Figura 3](#), página [59](#): Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control: 9000 RFU

[Figura 4](#), página [60](#): Controlo negativo sem ADN (NTC): 9000 RFU

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder

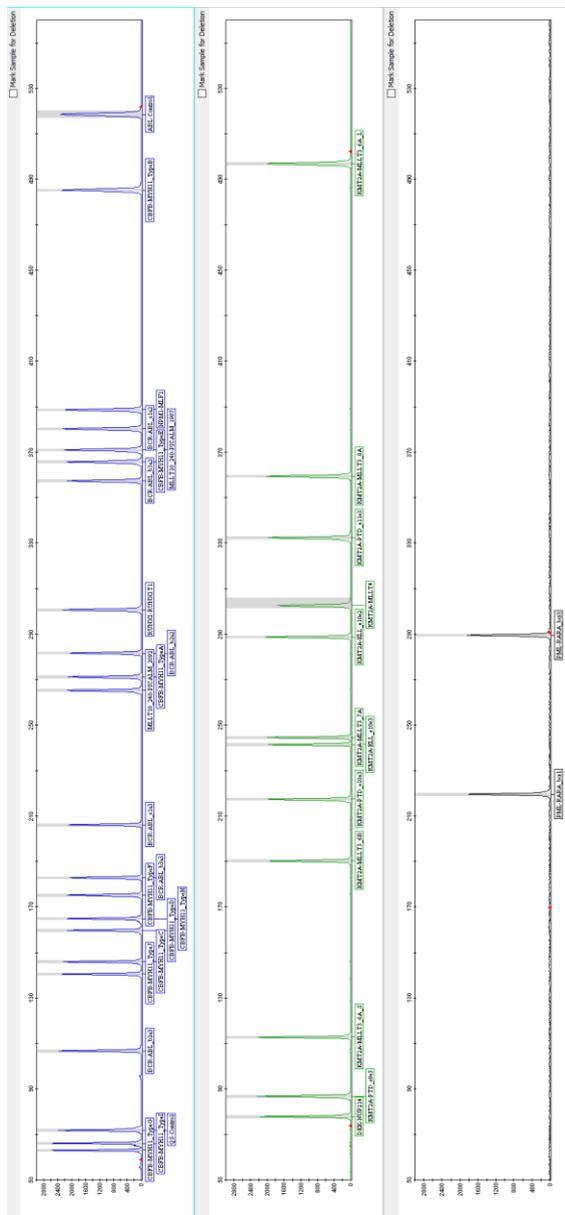


Figura 2 Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder

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

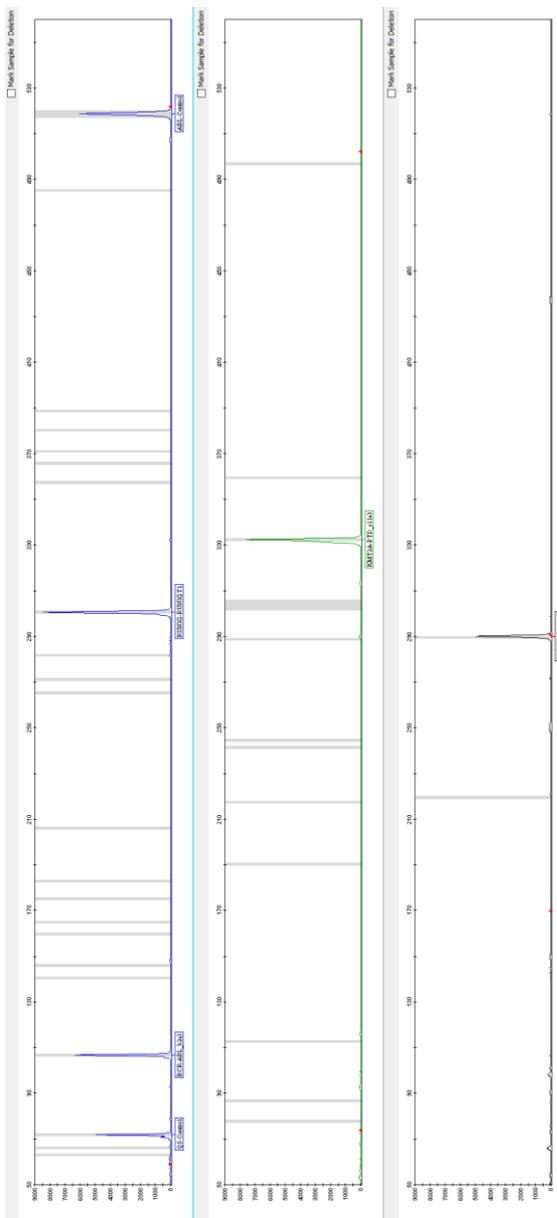


Figura 3 Mentype[®] AMLplex^{QS} Positive Control (PC)

No template control (NTC)

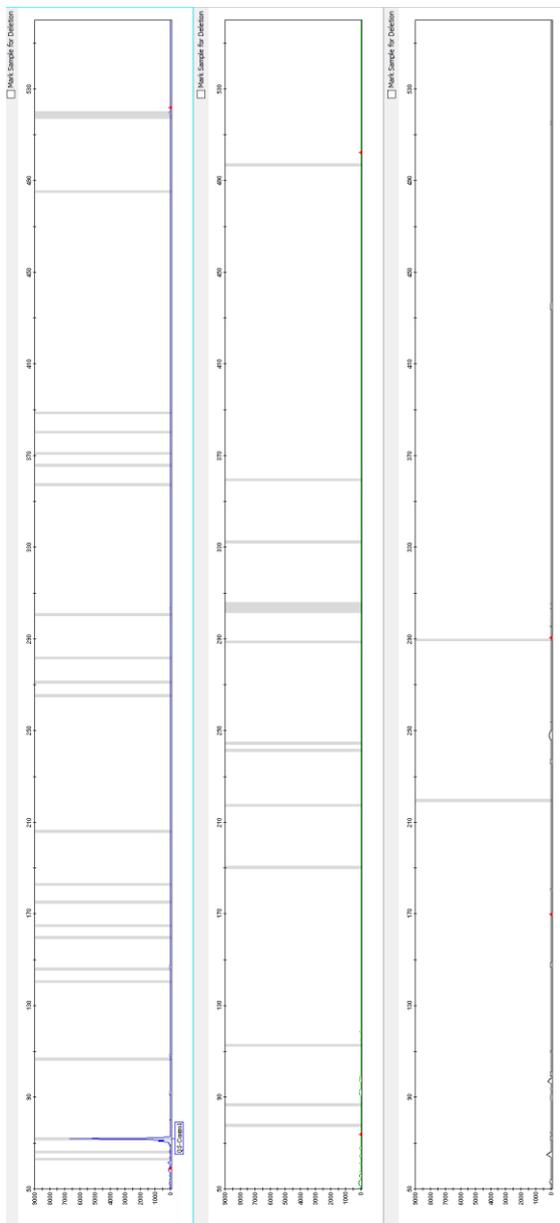


Figure 4 No template control (NTC)

BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Tel.: +49 351 8838 400

Fax: +49 351 8838 403

www.biotype.de

Encomendas

sales@biotype.de

Assistência técnica e apoio ao cliente

support@biotype.de

