

Mentype® AMLplex^{QS}

PCR Amplification Kit

Instrukcja obsługi (IFU)



0483

Do zastosowań w diagnostyce in vitro

AMLIFU02v2pl
23.07.2025



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



Kod partii



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY
Strona internetowa: www.biotype.de
E-mail: support@biotype.de
Zamówienie: sales@biotype.de



Informacja o zmianie

Należy uwzględnić poniższe adaptacje porównane do poprzedniej wersji IFU:

Kod dokumentu	Zmiany	Data
AMLIFU02v1pl	Wersja początkowa	28.05.2025
AMLIFU02v2pl	Aktualizacja tabeli 8	23.07.2025

**Wersja drukowana niniejszej IFU może zostać dostarczona
bezpłatnie w ciągu 7 dni.**

**W razie dalszych pytań prosimy o kontakt
pod nr. +49 351 8838 400 lub support@biotype.de**

Spis treści

Przeznaczenie	4
Podstawy naukowe.....	4
Opis produktu	5
Dostarczone materiały	7
Opis komponentów	8
Przechowywanie i korzystanie z odczynników.....	9
Materiały i urządzenia wymagane, ale niedostarczone	9
Ogólne wyposażenie laboratoryjne	9
Odczynniki, zestawy i materiały eksploatacyjne	10
Instrumenty i oprogramowanie	11
Próbki i próbki testowe	13
Ostrzeżenia i środki ostrożności.....	13
Uwaga dla użytkownika.....	14
Procedura	15
Przegląd eksperymentalnego przebiegu pracy	15
Przygotowanie próbek	15
Przygotowanie elementu kontrolnego	19
Konfiguracja głównej mieszanki	19
Amplifikacja PCR	21
Kapilarna elektroforeza żelowa	23
Przygotowanie produktów PCR	23
Analiza długości fragmentu	24
Analiza danych.....	26
Ogólna procedura analizy danych.....	26
Analiza próbek.....	30
Analiza danych z GeneMapper™ ID-X	32

Rozwiązywanie problemów	35
Ocena skuteczności	39
Czułość analityczna	39
Specyfika analityczna	41
Dokładność i prawdziwość	42
Precyzja	43
Punkt graniczny testu	43
Elementy zakłócające i reakcje krzyżowe	43
Stabilność w użyciu	45
Dane skuteczności klinicznej	46
Ocena diagnostyczna	48
Kontrola jakości	49
Pomoc techniczna	49
Referencje	50
Ograniczenia stosowania	50
Informacje o zamawianiu	52
Znaki towarowe i zastrzeżenia	52
Objaśnienie symboli	53
Załącznik	55

Przeznaczenie

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit to ręczny test przeznaczony do zastosowania w badaniu jakościowy 11 fuzji genów z łącznie 34 wariantami transkrypcyjnymi, co pozwala na identyfikację aberracji chromosomowych z odniesieniem diagnostycznym, prognozującym i terapeutycznym dla dorosłych pacjentów chorych na ostrą białaczkę szpikową lub z takim podejrzeniem (AML).

Test jest stosowany z komplementarnym DNA (cDNA), który był transkrybowany wstecznie z RNA komórkowego, ekstrahowanego z próbek krwi pełnej obwodowej żyłnej lub szpiku kostnego.

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit jest stosowany do wykrywania aberracji chromosomowych dla decyzji klinicznych właściwych w przypadku ostrej białaczki szpikowej. Identyfikacja właściwych translokacji genetycznych pozwala na klasyfikację chorób białaczkowych i zapewnia kluczowe informacje dla uzasadnienia diagnostycznego określającego terapię dla pacjentów według ryzyka.

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit jest przeznaczony dla profesjonalnych użytkowników laboratoriów w technikach genetycznych molekularnych, PCR multipleksowych i korzystania z Genetic Analyzer z Thermo Fisher Scientific (dział Applied Biosystems).

Podstawy naukowe

Weryfikacja specjalnych aberracji chromosomowych ma wysoką wartość prognozowania w prawie wszystkich typach ostrej białaczki. Dowody biologiczne molekularne aberracji chromosomowych (translokacje) stanowią ważne uzupełnienie diagnostyki. Wykrywanie właściwych translokacji pozwala na klasyfikację podtypu chorób białaczkowych i zapewnia kluczowe informacje dla terapii dla pacjentów według ryzyka.

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit ułatwia wykrywanie najbardziej powszechnych aberracji chromosomowych obserwowanych dotychczas w AML i stanowiących łatwe w użyciu, zgodne z rutyną oraz niezawodne narzędzie kontrolne.

Opis produktu

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit Zawiera zoptymalizowane odczynniki dla wykrywania wysokiej rozdzielczości 11 genów fuzyjnych z 34 wariantami transkrypcyjnymi łącznie (patrz [Tabela 1](#)). Nazewnictwo wariantów wynika z historycznie ustalonych nomenklatur, zwłaszcza dla KMT2A (Schnittger et al., 2000). Pełna lista genów, ich nazw alternatywnych oraz ID transkrypcji stosowanych dla opisów wariantów systematycznych znajduje się w załączniku (patrz [Lista genów docelowych](#)).

Test obejmuje wewnętrzny element kontrolny PCR (Quality Sensor “QS-Control”), który jest niezależny od szablonu i element kontrolny cDNA zależny od szablonu (ABL-Control), co zapewnia pomocne informacje o skuteczności PCR, jakości stosowanych szablonów cDNA i obecności inhibitorów PCR.

Test jest przeprowadzany przez analizę fragmentu przy użyciu kapilarnej elektroforezy żelowej. Jeden starter dla każdej transkrypcji jest oznaczony fluorescencyjnie przez 6-FAM, BTG lub BTY, zakres kolorów akcesoriów Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE, GmbH).

Tabela 1 Fuzje genów i warianty transkrypcyjne wykrywalne z Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit

Fuzja genów	Aberracja chromosomowa	Wariant	Systematyczny opis wariantu
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

Fuzja genów	Aberracja chromosomowa	Wariant	Systematyczny opis wariantu
		Type G	CBFB:e4::MYH11:e29
		Type H	CBFB:e4::MYH11:e28
		Type I	CBFB:e4::MYH11:e34
		Type J	CBFB:e5::MYH11:e30
DEK::NUP214	t(6;9) (p23.3;q34.1)	-	DEK:e9::NUP214:e18
KMT2A::MLLT4	t(6;11) (q27;q23.3)	-	KMT2A:e8::AFDN:e3
KMT2A::MLLT3	t(9;11) (p21.3;q23.3)	6A (6A_S; 6A_L)	KMT2A:e8::MLLT3:e6
		7A	KMT2A:e8::MLLT3:e7
		8A	KMT2A:e8::MLLT3:e8
		6B	KMT2A:e8::MLLT3:e6
KMT2A::ELL	t(11;19) (q23.3;p13.1)	e10e2	KMT2A:e8::ELL:e2
		e10e3	KMT2A:e8::ELL:e3
KMT2A-PTD	Partial Tandem Duplication	e9e3	KMT2A:e8::KMT2A:e2
		e10e3	KMT2A:e9::KMT2A:e2
		e11e3	KMT2A:e10::KMT2A:e2
NPM1::MLF1	t(3;5) (q25.3;q35.1)	-	NPM1:e6::MLF1:e2
PML::RARA	t(15;17) (q24.1 q21.2)	bcr1	PML:e6::RARA:e3
		bcr2	PML:e5::RARA:e3
		bcr3	PML:e3::RARA:e3

Test został zatwierdzony przez kontrolę fuzji genów ~ 300 pacjentów AML i jego przystosowanie zostało potwierdzone w porównawczym badaniu oceny klinicznej.

Limit wykrywania oceny jakościowej to 400 RFU. Średnio co najmniej 1000 kopii można wykrywać dla każdej fuzji genów.

Ogólny zakres wejściowy w standardowych warunkach do odwrotnej reakcji transkrypcyjnej definiuje się jako 100 ng na 1 µg łącznie RNA izolowanego z krwi pełnej lub szpiku kostnego.

Optymalne wejście do odwrotnej transkrypcji dla szpiku kostnego definiuje się jako 500 ng RNA i 1 µg RNA dla krwi peryferyjnej. Stosuje się wówczas 1 µL cDNA w trakcie PCR.

Dostarczone materiały

Tabela 2 Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit Spis treści

Odczynnik	Kolor korka	Objętość na rozmiar opakowania		
		25 reakcji	100 reakcji	400 reakcji
Nuclease-Free Water	Jasnoniebieski	1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Fioletowy	125 µL	500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® AMLplex ^{QS} Primer Mix	Czerwony	63 µL	250 µL	4 x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Biały	10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Positive Control	Biały	25 µL	25 µL	25 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Pomarańczowy	13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Allelic Ladder	Zielona	25 µL	25 µL	4 x 25 µL

Przegląd numerów partii podany jest na etykiecie umieszczonej wewnątrz klapy pudełka.

UWAGA

Należy pamiętać, że rozmiar opakowania opisuje liczbę testów **bez** uwzględniania liczby wymaganych elementów kontrolnych lub wymaganego dostępu do pipetowania.

i

Zalecamy stosowanie poniższego rozmiaru dla właściwej przepustowości:

- < 8 próbek na cykl PCR: 25 reakcji rozmiar opakowania
- 8 - 45 próbek na cykl PCR: 100 reakcji rozmiar opakowania
- > 45 próbek na cykl PCR: 400 reakcji rozmiar opakowania

Opis komponentów

Nuclease-Free Water: PCR woda stopnia, stosowana w konfiguracji PCR i jako element kontrolny szablonu (NTC).

Reaction Mix A: PCR bufor zawierający dNTPs i MgCl₂. Bufor PCR jest zoptymalizowany do promowania aktywności enzymów dla PCR.

Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix: mieszanka startera oligonukleotydowego multipleksowego zawierająca oznaczony starter (etykieta: 6-FAM[™], BTG, BTY) startery nieetykietowane.

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

Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control: mieszanina dwuniciowego sztucznego DNA pięciu fragmentów DNA. Stosowana jako jakościowy zewnętrzny element kontrolny PCR, który jest pozytywny dla poniższych celów na wszystkich 3 panelach: BCR::ABL_b2a3, RUNX1::RUNX1T1, ABL-Control, KMT2A-PTD_e11e3 i PML::RARA_bcr3, dodatkowo QS-Control jest amplifikowany jako marker jakości dla ważności próbki.

UWAGA

i

Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control nie jest krytyczne dla pracownika laboratorium, ponieważ składa się z indywidualnych molekuł DNA, które zostały oczyszczone, nie stanowią zagrożenia i nie mają aktywnych funkcji biologicznych. Nie zawiera żywych komórek ani organizmów patogenicznych, które mogą stanowić bezpośrednie zagrożenie.

DNA Size Standard 550 (BTO): mieszanina fragmentów PCR oznakowanych fluoroforowo zdefiniowaną długością fragmentu między 60 - 550 bp, komponent jest dodawany do każdego produktu PCR przed analizą długości fragmentu, jest stosowany do regresji rozmiaru w celu dokładnego określenia długości fragmentu produktów PCR.

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder: mieszanina fragmentów PCR z oznaczeniem fluoroforowym stanowiąca wszystkie wykrywalne allele Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit. Zawiera 22 fragmenty

oznaczone jako 6-FAM™, 12 fragmentów oznaczonych jako BTG i 2 fragmenty oznaczone jako BTY, stosowane jako odniesienie genotypowe dla dokładnej identyfikacji alleli.

Przechowywanie i korzystanie z odczynników

Zestaw jest dostarczany na suchym lodzie. Komponenty zestawu powinny docierać zamrożone, z wyjątkiem Multi Taq 2 DNA Polymerase, która jest przechowywana w buforze zapobiegającym zamarzaniu odczynnika.

Należy sprawdzić kompletność zestawu po odebraniu. Nie używać zestawów, które zostały rozmrożone po przybyciu. Jeśli jeden lub kilka komponentów nie jest zamrożonych lub jeśli rurki opakowania zostały naruszone podczas transportu, nie można zapewnić sprawności.

Przechowywać wszystkie komponenty w temperaturze od -25 °C do -15 °C i chronić je przed światłem. W szczególności Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix, DNA Size Standard 550 (BTO) i Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder należy przechowywać zabezpieczone przed światłem.

Aby nie dopuścić do kontaminacji, zalecamy, aby komponenty wstępnej amplifikacji (próbki RNA i cDNA, Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control) i komponenty po amplifikacji (DNA Size Standard 550 (BTO) i Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder) były przechowywane i stosowane oddzielnie od odczynników PCR (Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A i Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix).

Ważność zestawu upłynie zgodnie z informacją na etykiecie pudełka zestawu lub 24 miesiące po otwarciu, zależnie od tego, co nastąpi najpierw. Nie przekraczać maksymalnie 20 cykli rozmrażania.

Materiały i urządzenia wymagane, ale niedostarczone

Ogólne wyposażenie laboratoryjne

- Wirówka pulpitowa z wirnikiem do rurek reakcyjnych 2 mL i 200 µL
- Wirówka z wirnikiem do płytek do mikromiareczkowania do 96-dołkowych płytek reakcyjnych
- Mieszalnik wirowy

- Regulowane pipety kalibrowane z końcówkami filtracyjnymi szczelnymi na aerosol odpadowy
- Odpowiednie płytki reakcyjne 96-dołkowe lub rurki reakcyjne 200 µL z odpowiednim materiałem zamykającym, stopień PCR
- Odpowiednie szafy na rurki reakcyjne 2 mL i 200 µL
- Szafy chłodzące odpowiednie do rurek 2 mL
- Jednorazowe rękawice bez proszku
- NanoDrop™ One Spectrophotometer lub Qubit™ Fluorometer

UWAGA



Wszystkie materiały stosowane do PCR powinny mieć odpowiednią jakość (bez DNA i do biologii molekularnej). Należy się upewnić, że wszystkie stosowane instrumenty zostały zainstalowane, skalibrowane, sprawdzone i konserwowane zgodnie z instrukcjami oraz zaleceniami producenta.

Odczynniki, zestawy i materiały eksploatacyjne

Tabela 3 Odczynniki wymagane, ale niedostarczone

Należy pamiętać, że niektóre odczynniki i materiały eksploatacyjne są stosowane w określonych kombinacjach i nie wszystkie są wymagane dla każdego cyklu.

Odczynnik	Dostawca	Numer zamówienia
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

Odczynnik	Dostawca	Numer zamówienia
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

Instrumenty i oprogramowanie

Oprócz ręcznych metod ekstrakcji na bazie kolumny zgodnie z opisem w rozdziale Przygotowanie próbek, do ekstrakcji RNA można stosować poniższą automatyzację:

- urządzenie Maxwell® CSC (nr kat.: AS6000, Promega)

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit zatwierdzono do stosowania z poniższymi cyklerami PCR:

- ProFlex PCR System (nr kat.: 4484073 (3 bloki próbek 32-otworowe), 4484075 (blok próbek 96-otworowy); Thermo Fisher Scientific)
- GeneAmp® PCR System 9700 Silver (wycofany, Thermo Fisher Scientific)
- Mastercycler nexus gradient (nr kat.: 6331000017, Eppendorf AG)
- Mastercycler ep-S (wycofany, Eppendorf AG)
- Biometra Tadvanced (nr kat.: 846-2-070-211; Analytik Jena)

Zastosowanie cyklow PCR innych niż podane wcześniej musi zostać zatwierdzone przez użytkownika. Muszą być spełnione poniższe specyfikacje:

- Podgrzewana pokrywka
- Blok odpowiedni do płytek/rurek reakcyjnych 200 µL
- Narastanie regulowane do 4 °C/s

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit zatwierdzono do stosowania z poniższym instrumentem i ustawieniami:

- Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), oprogramowanie wersja 4.0.1
 - POP-4™ Polymer dla 3500/3500xL Genetic Analyzer
 - POP-7™ Polymer dla 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), oprogramowanie wersja 1.2.4

Analiza danych została wykonana z oprogramowaniem:

- GeneMapper™ ID-X software, wersja 1.6 (Thermo Fisher Scientific), stosowanie właściwego produktu:
 - Analysis Methods: AMLplexIVD_Analysis1_v1x porządek
AMLplexIVD_Analysis4_v1x porządek
AMLplexIVD_Analysis7_v1x
 - Bins: AMLplexIVD_Bins1_v1x porządek
AMLplexIVD_Bins4_v1x porządek AMLplexIVD_Bins7_v1x
 - Panels: AMLplexIVD_Panel1_v1x porządek
AMLplexIVD_Panel4_v1x porządek
AMLplexIVD_Panel7_v1x
 - Size Standard: BTO_60-550_v1x

Ocena ręczna plików fsa lub wszelkich wyników podanych w oprogramowaniu dla gromadzenia danych bez oprogramowania opisanego do analizy danych i oceny nie jest zatwierdzona.

UWAGA



Należy się upewnić, że wszystkie stosowane instrumenty zostały zainstalowane, skalibrowane, sprawdzone i konserwowane zgodnie z instrukcjami oraz zaleceniami producenta.

Próbki i próbki testowe

Poniższe próbki zostały zatwierdzone z Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit :

- próbki krwi żyłnej peryferyjnej człowieka (EDTA, cytrynian, heparyna i stabilizator RNA Exact), przechowywane w temp. 4 °C i przetwarzane dla oczyszczania RNA w ciągu 24 godz.
- Probki szpiku kostnego (EDTA, heparyna), przechowywane w temp. 4 °C i przetwarzana dla oczyszczania RNA w ciągu 24 godz.

Uzyskany RNA należy przechowywać nierozcieńczony w temp. -85 °C do -70 °C.

UWAGA



Należy się upewnić, że antykoagulant stosowane do gromadzenia krwi jest zgodny z instrukcjami producenta zestawu izolacyjnego RNA.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Przed użyciem produktu przeczytać uważnie instrukcję obsługi.
- Przeczytać karty charakterystyki (SDS) i stwierdzenia niedotyczące zagrożeń (NHS) dla wszystkich produktów BIOTYPE, które są dostępne na żądanie lub na (www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter). W przypadku produktów, które nie wymagają SDS, ponieważ nie zawierają SVHC lub podlegają innym ograniczeniom rozporządzenia 1272/2008 (CLP), BIOTYPE dostarcza SDS na żądanie.
- Należy skontaktować się z producentami materiałów i odczynników wymaganych, ale nie dostarczonych do kopii SDS dla wszystkich dodatkowo potrzebnych odczynników.

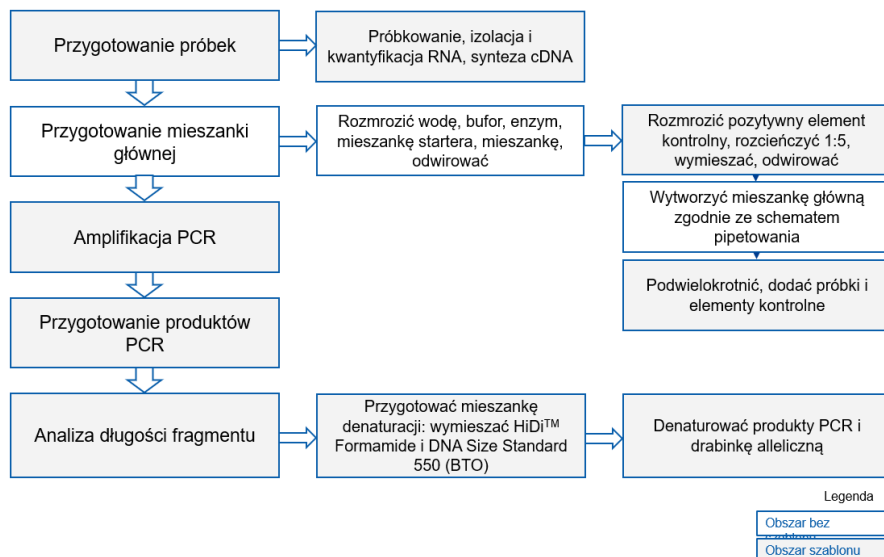
- Komponenty zestawu różnych partii zestawów nie mogą być mieszane.
- Podwielokrotnianie komponentów zestawu do innych naczyń reakcyjnych nie jest dozwolone.
- Stosowanie tego produktu jest ograniczone dla profesjonalnych użytkowników laboratoriów w technikach genetycznych molekularnych, PCR multipleksowych i korzystania z Genetic Analyzers z Thermo Fisher Scientific.
- Przed pierwszym użyciem należy sprawdzić produkt i jego komponenty w następującym zakresie:
 - integralność
 - kompletność w odniesieniu do liczby, typu i napełnienia (patrz rozdział Dostarczone materiały)
 - prawidłowe oznaczanie
 - zamrożenie po dostarczeniu (z wyjątkiem Multi Taq 2 DNA Polymerase)
- Próbkę powinny być zawsze traktowane jako zakaźne i/lub bioniebezpieczne zgodnie z bezpiecznymi procedurami laboratoryjnymi.
- Nie używać zestawu, którego data ważności upłynęła.
- Usuwać odpady z próbek i testów zgodnie z lokalnymi przepisami bezpieczeństwa i utylizacji.
- Wszystkie stosowane instrumenty zostały zainstalowane, skalibrowane, sprawdzone i konserwowane zgodnie z instrukcjami oraz zaleceniami producenta.

Uwaga dla użytkownika

Wszystkie problemy, jakie się pojawiają w odniesieniu do produktu, użytkownik musi zgłaszać producentowi. Wszystkie poważne zdarzenia powiązane z tym zestawem muszą być zgłaszane do producenta i odpowiednich organów państw członkowskich, których przebywa użytkownik i/lub pacjent. Podsuwanie bezpieczeństwa i skuteczności (SSP) zostało utworzone zgodnie z art. 29 rozporządzenia (EU) 2017/746 i przeznaczone dla zapewnienia dostępu publicznego przez bazę danych EUDAMED do zaktualizowanego podsumowania danych bezpieczeństwa i skuteczności urządzenia wyznaczonym użytkownikom, w przypadku tego produktu tylko pracownicy laboratorium.

Procedura

Przegląd eksperymentalnego przebiegu pracy



Przygotowanie próbek

Wymagania surowych próbek

Próbka dla Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit jest zdefiniowana jako cDNA transkrybowane z RNA ekstrahowanego z krwi pełnej żyłnej peryferyjnej lub szpiku kostnego pobranego od ludzi.

Zalecamy stosowanie odczynników dla stabilizacji RNA podczas gromadzenia próbek. Stabilizatory RNA pomagają zachować integralność RNA (np. S-Monovette RNA Exact). Izolację RNA należy przeprowadzić niezwłocznie po pobraniu próbki.

UWAGA

Długie przechowywanie materiału surowych próbek może powodować fragmentację materiału genetycznego i w efekcie skutkować niedostateczną jakością materiału. Może to pogarszać wyniki analizy, np. z powodu zmniejszonych sygnałów lub nieprawidłowych wewnętrznych elementów kontrolnych.

Krew

Pobrać co najmniej 200 µL próbki peryferyjnej pełnej krwi żyłnej dla poniższej procedury.

Wykorzystanie peryferyjnej pełnej krwi żyłnej powinno być zgodne z zaleceniami Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline MM05–A2 (2nd edition), gdzie stwierdzono, że pełną krew można przechowywać w temperaturze pokojowej (22 °C do 25 °C) do 24 godzin lub od 2 °C do 6 °C przez 72 godziny lub więcej. Ponadto zaleca się, aby antykoagulantami stosowanymi do pobierania krwi pełnej, były EDTA, cytrynian lub heparyna.

Szpik kostny

Pobrać co najmniej 200 µL próbki szpiku kostnego dla poniższej procedury.

Korzystanie z aspiratów szpiku kostnego powinno być zgodne z zaleceniami CLSI guideline MM05–A2 (2nd edition), gdzie stwierdzono, że antykoagulowane (EDTA lub cytrynian) aspiraty szpiku kostnego powinny być przechowywane i transportowane w temp. 4 °C. RNA powinno być ekstrahowane w ciągu 1-4 godz. po próbkowaniu, aby uzyskać najlepsze rezultaty.

Ekstrakcja RNA

Wykonać ekstrakcję i oczyszczanie RNA z aspiratów peryferyjnej krwi pełnej (PB) lub szpiku kostnego (BM) z jednym z poniższych zestawów:

- RNeasy® Midi/ Mini/ Plus Mini Kit (Qiagen GmbH) dla antykoagulantów EDTA, cytrynianu i heparyny w BM i PB

- NucleoSpin® Dx RNA Blood (Macherey-Nagel) dla stabilizatora RNA Exact w PB
- Maxwell® CSC RNA Blood Kit (Promega) dla antykoagulantów EDTA i heparyny w BM

Postępować zgodnie z zaleceniami i instrukcjami producenta w zakresie ekstrakcji RNA. Zaleca się przeprowadzenie **trawienia DNase** podczas izolacji zgodnie z instrukcjami producenta.

UWAGA



Zanieczyszczenie krwi można wykryć wzrokowo w reakcji PCR lub w izolowanym RNA przez zmianę koloru pomarańczowego. W przypadku zauważenia zmiany koloru zalecamy powtórzenie izolacji RNA, aby uniknąć potencjalnych zakłóceń

UWAGA



Upewnić się, że wyeliminowano wszystkie ślady etanolu przed elucją kwasu nukleinowego. Etanol jest silnym inhibitorem PCR.

Kwantyfikacja i rozcieńczanie RNA

Kwantyfikacja stężenia RNA przez spektroskopię UV/VIS przy 260 nm za pomocą NanoDrop spectrophotometer lub spektroskopię fluorescencyjną za pomocą Qubit™ Fluorometer.

W przypadku stosowania spektrofotometrii należy korzystać z bufora elucji z zestawu ekstrakcji RNA do mierzenia ślepych prób. Współczynnik A260/A280 powinien być w zakresie 1,9 - 2,1, natomiast współczynnik A260/A230 powinien być w zakresie 1,8 – 2,3.

Dla kwantyfikacji fluorometrycznej RNA należy użyć Qubit™ Fluorometer z Qubit™ RNA HS Assay-Kit lub Qubit™ RNA BR Assay-Kit .

W przypadku stosowania z Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit należy rozcieńczyć próbki RNA do odpowiedniego stężenia dla późniejszej

transkrypcji do cDNA. Przygotować rozcieńczenie świeżo przed użyciem. Używać wody bez nukleazy jako rozcieńczalnika.

UWAGA



Zakres wejściowy dla transkrypcji do cDNA jest zgodny z instrukcjami producenta zestawu transkrypcji. Stosowanie 100 ng - 1 µg RNA w objętości ostatecznej reakcji 20 µL dla syntezy cDNA jest zatwierdzone dla obydwu typów próbki. Zalecamy stosowanie optymalnie **500 ng dla szpiku kostnego** i **1 µg dla krwi peryferyjnej**.

Przechowywanie RNA

Przechowywać nierozcieńczone próbki RNA w wodzie bez RNase w temp. -25 °C do -15 °C do 24 godzin lub -85 °C do -70 °C przez maksymalnie rok.

Transkrypcja do cDNA

Wykonaj syntezę cDNA zgodnie z instrukcjami producenta, używając jednego z poniższych zestawów:

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

*zalecane dla niewielkiej ilości RNA

UWAGA



Inaktywacja cieplna odwrotnej transkryptazy ma kluczowe znaczenie do skuteczności PCR. Szczegóły podano w instrukcji producenta.

Przechowywanie cDNA

Przechowywać próbki cDNA w temp. -25 °C do -15 °C przez maksymalnie rok.

Przygotowanie elementu kontrolnego

Pozytywny element kontrolny (PC)

Rozmrozić Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control, zhomogenizować przez ostrożne mieszanie i późniejsze szybkie wirowanie.

Rozcieńczyć Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control 1:5 przy pomocy Nuclease-Free Water dołączonego w zestawie. Np. mieszanka 1 µL elementu kontrolnego z 4 µL Nuclease-Free Water.

Homogenizować rozcieńczony PC przez ostrożne mieszanie. Następnie szybko odwirować rozcieńczony PC (ok. 5 s).

Nie przechowywać rozcieńczonego pozytywnego elementu kontrolnego.

UWAGA



Zawsze stosować świeży rozcieńczalnik Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control.

Element kontrolny bez szablonu (NTC)

Zastosować wodę bez nukleazy dołączoną w zestawie jako element kontrolny bez szablonu NTC zamiast próbki.

Konfiguracja głównej mieszanki

Usunąć i rozmrozić poniższe komponenty z Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit :

- Nuclease-Free Water (jasnoniebieski korek)
- Reaction Mix A (fioletowy korek)
- Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix (czerwony korek)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (biały korek)

Wszystkie zamrożone komponenty muszą zostać rozmrożone w temperaturze pokojowej (22 °C do 25 °C, ok. 30 min, z zabezpieczeniem przed światłem) i homogenizowane przed odwrócenie rurek, pipetowanie lub delikatne mieszanie. Następnie szybko odwirować odczynniki (ok. 5 s).

Przed konfiguracją mieszanki głównej zaleca się trzymanie Multi Taq 2 DNA Polymerase w chłodnym środowisku jak najdłużej (np. w lodówce).

UWAGA

Mieszać Multi Taq 2 DNA Polymerase przez strzepywanie, aby uzyskać dłuższą stabilność – **nie mieszać enzymu**.

Przygotować PCR mieszankę główną zgodnie z Tabela 4 w rurce mikrowirówki o odpowiednim rozmiarze dla łącznej liczby próbek testowanych w wyznaczonym obszarze czystym. Uwzględnić co najmniej jeden PC i jeden NTC w swoich obliczeniach.

UWAGA

Ogólna zasada jest taka, że w przypadku testowania mniej niż 10 próbek należy stosować dostateczną ilość mieszanki głównej dla jednej dodatkowej próbki. W przypadku testowania 10 lub więcej próbek, należy użyć nadmiernej objętości mieszanki głównej odczytnika +10 %.

Tabela 4 PCR Konfiguracja reakcji mieszanki głównej

Komponent	Objętość		
	# 1	# 5	# 10
Nuclease-Free Water*	16,1 µL	80,5 µL	161,0 µL
Reaction Mix A	5,0 µL	25,0 µL	50,0 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Primer Mix	2,5 µL	12,5 µL	25,0 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	0,4 µL	2,0 µL	4,0 µL
Szablon cDNA lub próbka kontrolna*	1,0 µL	5 x 1,0 µL	10 x 1,0 µL
Łączna objętość	25,0 µL	125,0 µL	250,0 µL

*Wejście szablону można zwiększyć do 2 µL, dla tej objętości konieczne jest wyregulowanie wody bez nukleazy.

Wymieszać mieszankę główną przez delikatne mieszanie, a następnie szybkie odwirowanie.

Podwielokrotnie 24,0 µL mieszanki głównej PCR w przygotowanych rurkach 200 µL PCR i szybko odwirować w zamkniętych rurkach.

Stosowanie szablonów i elementów kontrolnych cDNA

Dodać 1,0 µL poniższych typów próbek do przygotowanych rurek PCR zawierających mieszanekę główną PCR.

NTC: dodać 1,0 µL Nuclease-Free Water zamiast próbki.

Szablon cDNA: dodać 1,0 µL nierozcieńczonych próbek cDNA.

PC: dodać 1,0 µL świeżo przygotowanego, rozcieńzonego 1:5 Mentype® AMLplex^{QS} Positive Contro zamiast próbki.

UWAGA



Najpierw przygotować NTC, aby uniknąć zanieczyszczenia elementu kontrolnego. Przygotować PC na koniec, aby uniknąć zanieczyszczeń krzyżowych próbek.

UWAGA



Stosować co najmniej jeden pozytywny element kontrolny PC i jeden element kontrolny bez szablonu NTC na cykl. W innym przypadku nie będzie można zatwierdzić cyklu.

Zamknąć wszystkie rurki PCR, delikatnie wymieszać i odwirować.

Amplifikacja PCR

Zaprogramować cykl PCR z poniższym profilem amplifikacji, upewnić się, że to ustawiono narastanie do 4 °C/s. Wykonać „gorące uruchomienie” PCR w celu aktywowania polimerazy i niedopuszczenia do powstania niespecyficznych produktów amplifikacji.

UWAGA

Stosowanie skalibrowanych i dobrze utrzymanych cykliów PCR ma kluczowe znaczenie, ponieważ odchyłki mogą negatywnie wpłynąć na amplifikację wrażliwych celów, np. KMT2A::MLLT4.

Tabela 5 Protokół PCR

Temperatura	Czas	
96°C	4 min	(gorące uruchomienie w celu aktywacji polimerazy)
96°C	30 s	
60°C	120 s	25 cykli
72°C	75 s	
68°C	10 min*	
10°C	∞	wstrzymanie

* W przypadku zauważenia wyższej liczby negatywnych szczytów adeniny (-1 bp), możliwe jest rozszerzenie do 60 min.

UWAGA

Jeśli stosować są cyktery termiczne z regulowanymi wielkościami ogrzewania i chłodzenia, **narastanie należy wyregulować do 4 °C/s**, aby zapewnić optymalną równowagę zestawu.

UWAGA

Podstawowe informacje dotyczące konfiguracji, programowania i konserwacji różnych instrumentów PCR znajdują się w instrukcji obsługi danego instrumentu.

Kapilarna elektroforeza żelowa

Przygotowanie produktów PCR

Po wykonaniu PCR należy szybko usunąć próbki z cyklera i wirówki.

UWAGA



Po wykonaniu PCR produkty PCR można przechowywać przez 4 tygodnie w temp. od 2 °C do 8 °C lub długo w temp. od -25 °C do -15 °C zabezpieczone przed światłem.

Rozmrażanie, mieszanie i wirowanie odczynników:

- Hi-Di™ Formamide (niezawarte w zestawie)
- Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder (zielony korek)
- DNA Size Standard BTO (550) (pomarańczowy korek)

Przygotować mieszaninę denaturacji opisaną w [Tabela 6](#) i dodać jedną lub dwie reakcje, aby skompensować różnorodność pipetowania. Dołączyć dodatkową reakcję dla drabinki alleicznej.

Tabela 6 Mieszanina denaturacji

Komponent	Objętość na reakcję
Hi-Di™ Formamide	12,0 µL
DNA Size Standard BTO (550)	0,5 µL

Pipeta 12,0 µL mieszaniny denaturacji w otworach płytki PCR (odpowiedniej do użycia w Genetic Analyzer).

Dodać 1,0 µL produktu PCR lub 1,0 µL Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder do otworów. Uszczelnić płytkę PCR odpowiednią folią, wymieszać i odwirować płytkę szybko.

UWAGA



Drabinka alleliczna jest stosowana do prawidłowego określania fragmentów analizowanych w trakcie analizy danych. W każdym cyklu analizy długości fragmentu drabinka alleliczna musi być analizowana co najmniej raz, aby zapewnić skuteczną analizę danych.

UWAGA



Kapilary urządzenia do elektroforezy żelowej nigdy nie mogą pracować na sucho. Jeśli próbki nie zajmują wszystkich pozycji kapilarnych, należy napęłnić dodatkowe otwory płytki 12,0 µL Hi-Di™ Formamide zgodnie z numerem kapilary.

Denaturować przygotowane produkty PCR na cyklerze PCR przez 3 minuty w temp. 95 °C, a następnie schłodzić próbki do 4 °C w cyklerze. Wirować próbki szybko przez analizę długości fragmentu.

Analiza długości fragmentu

Przed wykonaniem pierwszej analizy długości fragmentu uruchomić **Matrix Standard BT5 multi** (BIOTYPE GmbH), aby wykonać wyrównanie spektralne stosowanych barwników fluorescencyjnych Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit (6-FAM™, BTG, BTY, BTO).

UWAGA



Przestrzegać instrukcji obsługi Matrix Standard BT5 multi w zakresie tej instalacji. Są one dostępne na www.biotype.de/en/ifus lub na żądanie pod adresem support@biotype.de od BIOTYPE GmbH.

Po pomyślnym wykonaniu Matrix Standard BT5 multi należy zaimportować podane ustawienia instrumentu dla 3500 Genetic Analyzer zgodnie z opisem w Tabela 7 (www.biotype.de/en/template-files).

Tabela 7 zawiera pliki dla Genetic Analyzers
www.biotype.de/en/template-files

3500 Series Genetic Analyzer	
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

Specyfikacje wymaganego protokołu instrumentu opisano w Tabela 8. Tylko opisane parametry powinny być regulowane, inne parametry powinny pozostać w domyślnym ustawieniu. Przestrzegać instrukcji obsługi producenta do zastosowania określonych parametrów działania.

Tabela 8 Parametry dla modułów działania różnych urządzeń kapilarnej elektroforezy żelowej

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

W przypadku różnic od wartości podanych w Tabela 8 czas cyklu można regulować, aby upewnić się, że wszystkie fragmenty (60-550 bp) DNA Size Standard 550 (BTO) zostały przeanalizowane.

Aby skonfigurować Size Standard protocol, poniższe rozmiary dla DNA Size Standard 550 (BTO) należy przyporządkować do panelu pomarańczowego:

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 i 550 bp.

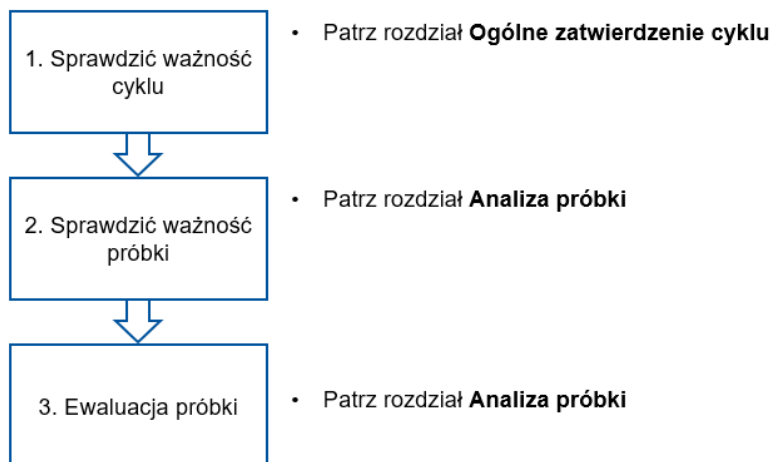
UWAGA



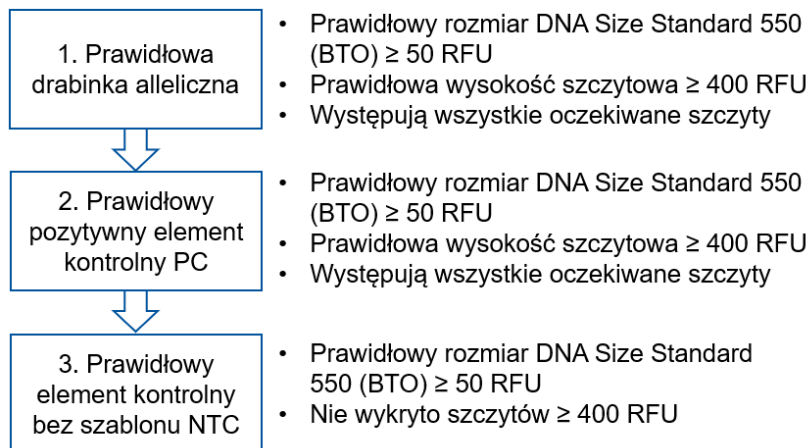
BIOTYPE GmbH dostarcza określone szablony dla łatwej instalacji konkretnych ustawień cyklu przy analizie długości fragmentu, a także szablony analizy do łatwej konfiguracji oprogramowania GeneMapper™ ID-X. Te szablony są dostępne do pobrania: www.biotype.de/en/template-files.

Analiza danych

Ogólna procedura analizy danych



Ogólne zatwierdzenie cyklu



UWAGA



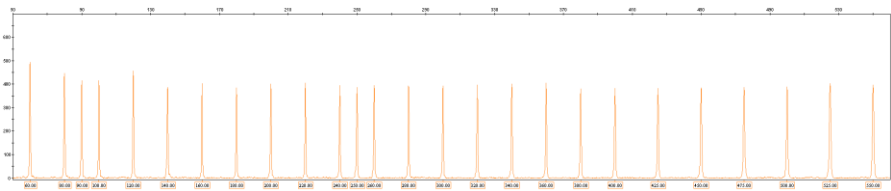
Należy przeanalizować cały zakres pomiarowy od 50 bp do 560 bp, aby ocenić ważność.

DNA Size Standard 550 (BTO)

Znalezienie dokładnej długości produktów amplifikowanych zależy od typu urządzenia, warunków elektroforezy, a także od stosowanego standardowego rozmiaru DNA. Ze względu na złożoność niektórych celów, określanie rozmiaru powinno być oparte na równomiernie dystrybuowanych odniesieniach.

Sprawdzić DNA Size Standard 550 (BTO) we wszystkich próbkach pod kątem poniższych kryteriów:

- Obecność wszystkich fragmentów na: **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 i 550 bp** (patrz [Rysunek 1](#))
- Wszystkie fragmenty są obecne z ≥ 50 RFU
- Współczynnik określania $R^2 > 0,995$ (patrz Size Match Editor z GeneMapper™ ID-X)
- Fragmenty nie zmniejszają się ciągle na wysokościach szczytowych z coraz większą długością fragmentu.



Rysunek 1 Elektroferogram fragmentów DNA Size Standard 550 (BTO), z długościami w bp

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder

Po zapewnieniu prawidłowego standardu rozmiaru należy sprawdzić, czy wszystkie szczyty w drabince allelicznej są obecne z **≥ 400 RFU**.

UWAGA

i

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder obejmuje jeden szczyt dla każdego wykrywanego celu. Należy porównać allele z załącznikiem Rysunek 2.

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

Po zapewnieniu prawidłowego standardu rozmiaru należy upewnić się, że wszystkie specyficzne szczyty dla PC są obecne z **≥ 400 RFU**. Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control, który jest w zestawie testowym, reprezentuje poniższe cele (patrz Tabela 9).

Tabela 9 Szczyty elementu kontrolnego w Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control

Panel	Szczyt elementu kontrolnego
Niebieski	▪ QS-Control ▪ BCR::ABL_b2a3 ▪ RUNX1::RUNX1T1 ▪ ABL-Control
Zielony	▪ KMT2A-PTD_e11e3
Żółty	▪ PML::RARA_bcr3

UWAGA



Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control zawiera co najmniej jeden szczyt dla każdego używanego panelu. Należy porównać allele z załącznikiem Rysunek 3.

No template control (NTC)

Po zapewnieniu prawidłowego standardu rozmiaru należy sprawdzić, czy nie są wykrywane szczyty wszystkie szczyty ≥ 400 RFU w NTC (patrz również załącznik Rysunek 4).

UWAGA



Przy stosowaniu GeneMapper ID-X razem z dostarczonymi plikami szablonu dla metody analizy szczyty < 400 RFU w próbkach Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit nie są automatycznie przypisywane do nazwy alleli, co pomaga w łatwej ocenie NTC.

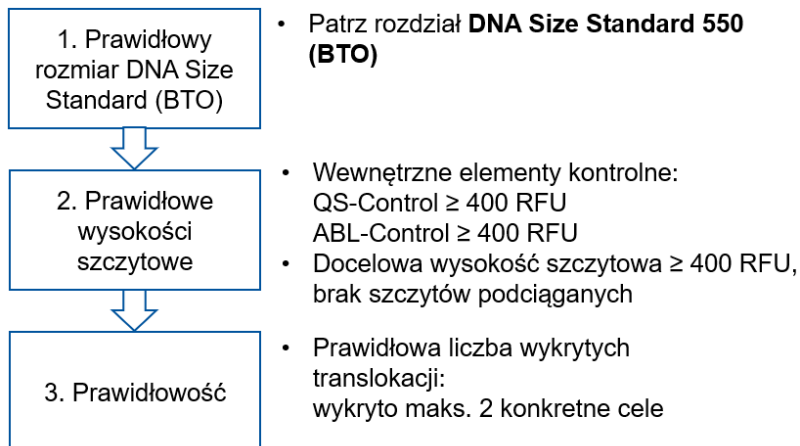
UWAGA



Artefakty, takie jak małe krople barwnika, mogą występować bardziej ewidentnie w NTC. Ze względu na szeroką bazę szczytów, nietypowy kształt szczytu i brak przypisania szczytu może dojść do różnic od szczytów ampliconu.

Analiza próbki

Analiza danych przepływu pracy



UWAGA



Jeśli wykrywanie wielu celów przekracza punkt graniczny lub jeśli występują niepewności, należy sprawdzić część Rozwiązywanie problemów (np. listę znanych połączeń sygnału) lub skontaktować się z działem obsługi klienta pod adresem support@biotype.de.

Przy stosowaniu GeneMapper™ ID-X software razem ze specyficznymi szablonami dostarczonymi przez BIOTYPE GmbH podstawowe zatwierdzenie odbywa się automatycznie.

Po sprawdzeniu ważności cyklu i próbki należy ocenić dane próbki.

UWAGA



Mentype® AMLplex^{QS} jest **testem wyłącznie jakościowym**. To zastosowanie nie jest przeznaczone do kwantyfikowania liczby kopii lub monitorowania choroby resztkowej (MRD).

W przypadku stosowania szablonów oceny BIOTYPE GmbH i pomyślnej oceny drabinki allelicznej cyklu, wykrywane fragmenty PCR są nazywane automatycznie. Przegląd długości fragmentów produktów PCR znajduje się w poniższej Tabeli 10.

Tabela 10 Przegląd długości fragmentów translokacji w Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder na polimerze POP-4™. ‡ Dwa amplikony dla wariantu KMT2A::MLLT3_6A; * mimo że ten wariant jest wykrywany z Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit, różna długość amplikonu (ok. 173 bp) zapobiega automatycznej alokacji

Panel/ translokacja	Długość [bp]	Panel / translokacja	Długość [bp]
FAM Panel (kanał niebieski)		BTG Panel (kanał zielony)	
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 (kanał żółty)	
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		

Panel/ translokacja	Długość [bp]	Panel / translokacja	Długość [bp]
BCR::ABL_e1a2	380		
NPM1::MLF1	389		
CBFB::MYH11_TypeB	485		
ABL-Control	519		

Analiza danych z GeneMapper™ ID-X

Przygotowanie GeneMapper™ ID-X software

Ogólne instrukcje zastosowania i analizy próbek w tym oprogramowaniu opisano w instrukcji użytkownika GeneMapper™ ID-X Software.

Alokacja alleli powinna zostać przeprowadzona z oprogramowaniem do analizy GeneMapper™ ID-X w połączeniu z plikami szablonu Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit z BIOTYPE GmbH. Pliki szablonu BIOTYPE (patrz [Tabela 11](#)) są dostępne na stronie internetowej (www.biotype.de/en/template-files) do pobrania lub na żądanie pod adresem support@biotype.de. Przepływ pracy analizy z wykorzystaniem GeneMapper™ ID-X software przedstawiono w [Tabela 12](#).

Tabela 11 Szablony BIOTYPE GmbH dla GeneMapper™ ID-X Software,
szablony specyficzne dla ¹POP-1™, ²POP-4™ and ³POP-7™ polymer

Szablon	Nazwa szablonu
Panels*	AMLplexIVD_Panel1_v1x ¹ AMLplexIVD_Panel4_v1x ² AMLplexIVD_Panel7_v1x ³ lub wersja wyższa
BinSets*	AMLplexIVD_Bins1_v1x ¹ AMLplexIVD_Bins4_v1x ² AMLplexIVD_Bins7_v1x ³ lub wersja wyższa
Size Standard*	BTO_60-550_v1x lub wersja wyższa
Analysis Method*	AMLplexIVD_Analysis1_v1x ¹ AMLplexIVD_Analysis4_v1x ² AMLplexIVD_Analysis7_v1x ³ lub wersja wyższa
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes

Szablon	Nazwa szablonu
Table Settings	Table for 2 Alleles
	Table for 10 Alleles

*Te szablony muszą być zawsze stosowane do analizy danych. Inne pliki szablonu są opcjonalne.

UWAGA

i

Import i wywołanie alleli z dostarczonymi plikami szablonu jest gwarantowany tylko w przypadku stosowania GeneMapper™ ID-X software. W przypadku stosowania GeneMapper™ software mogą wystąpić problemy z importem niektórych plików szablonu. Konieczne może być ustawienie Panels i Bins z jednym lub większą liczbą cyklu drabinki allelicznej przy specyficznej konfiguracji instrumentu. Aby uzyskać pomoc, należy się z nami skontaktować (support@biotype.de).

Tabela 12 Przepływ pracy analizy danych z GeneMapper™ ID-X

Nr	Ikona	Krok roboczy
1		Przygotowanie oprogramowania
		Panel Manager Zaimportować dostarczone pliki szablonów dla Panels i Bins
		GeneMapper™ ID-X Manager Zaimportować dostarczony szablon dla Analysis Method i Size Standard
2		Import próbki
		Add Samples to Project - przeglądać pod kątem folderu cyklu, wybrać i Add to List → Add
3		Analiza próbki

Nr	Ikona	Krok roboczy										
		Wybrać poniższe właściwości w odpowiednich kolumnach arkusza próbki i wybrać Analyze .										
		<table><tr><th>Nazwa kolumny</th><th>Wybór</th></tr><tr><td>Sample Type</td><td>Drabinka alleliczna, pozytywny element kontrolny, negatywny element kontrolny lub próbka</td></tr><tr><td>Analysis Method</td><td>Wybrać wcześniej zaimportowany szablon BIOTYPE AMLplexIVD_Analysis_v1x</td></tr><tr><td>Panel</td><td>Wybrać wcześniej zaimportowany BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x</td></tr><tr><td>Size Standard</td><td>Wybrać wcześniej zaimportowany BIOTYPE template BTO_60-550_v1x</td></tr></table>	Nazwa kolumny	Wybór	Sample Type	Drabinka alleliczna, pozytywny element kontrolny, negatywny element kontrolny lub próbka	Analysis Method	Wybrać wcześniej zaimportowany szablon BIOTYPE AMLplexIVD_Analysis_v1x	Panel	Wybrać wcześniej zaimportowany BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x	Size Standard	Wybrać wcześniej zaimportowany BIOTYPE template BTO_60-550_v1x
Nazwa kolumny	Wybór											
Sample Type	Drabinka alleliczna, pozytywny element kontrolny, negatywny element kontrolny lub próbka											
Analysis Method	Wybrać wcześniej zaimportowany szablon BIOTYPE AMLplexIVD_Analysis_v1x											
Panel	Wybrać wcześniej zaimportowany BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x											
Size Standard	Wybrać wcześniej zaimportowany BIOTYPE template BTO_60-550_v1x											
4		Sprawdzenie elementów kontrolnych										
		Sprawdzenie ważności elementów kontrolnych (drabinka alleliczna, pozytywny element kontrolny negatywny element kontrolny) Przy dostatecznych wysokościach szczytowych przypisanie jest wykonywane zgodnie ze specyfikacjami w Analysis Method										
5		Ocena próbki										
		Sprawdzić ważność próbki. Przy dostatecznych wysokościach szczytowych przypisanie jest wykonywane zgodnie ze specyfikacjami w Analysis Method										

UWAGA**i**

Przy zastosowaniu dostarczonych plików szablonu dla Analysis Method, Bins, Panels i wybraniu właściwego typu próbki ważność tych próbek jest sprawdzana przez oprogramowanie automatycznie. Znaczniki kontroli jakości SOS (Sample off-Scale), SQ (Sizing Quality), OMR (Outside Marker Range) powinny mieć formę zielonych pól, oznaczających zaliczenie ważności.

ARNM	SOS	SQ	SSPK	MIX	OMR	CGQ

UWAGA**i**

Stosować Size Match Editor w GeneMapper™ ID-X do oceny rozmiaru standardowego. Jeśli automatyczne wywołanie fragmentu nie powiedzie się, elementy potrójne 80 / 90 / 100 bp i 240 / 250 / 260 bp można stosować dla orientacji w ręcznym przypisaniu szczytu.

Rozwiązywanie problemów

Aby uzyskać dokładnie i niezawodne wykrywanie celów, należy przeprowadzić analizę po PCR, w tym automatyczne przypisanie celów i zatwierdzenie, z wykorzystaniem zatwierzonego GeneMapper ID-X software w połączeniu z plikami szablonu BIOTYPE. W razie niepewności należy skontaktować się pod adresem support@biotype.de.

Szczyty podciągane

Szczyty podciągane mogą wystąpić, jeśli wysokości szczytu są poza liniowym zakresem wykrywania lub jeśli zastosowano nieprawidłową matrycę. Pojawiają się one w pozycjach specyficznych szczytów w kanałach o innych kolorach, w szczególności z niewielkimi intensywnościami sygnału. Ten efekt należy uwzględnić w przypadku wysokich profili amplifikacji w poniższych celach:

- PML::RARA_bcr3 (kanał żółty) powoduje szczyt podciągany w KMT2A::ELL_e10e2 (kanał zielony)
- RUNX1::RUNX1T1 (kanał niebieski) powoduje szczyt podciągany w KMT2A::MLLT4 (kanał zielony, tylko wtedy, gdy zastosowano POP-7TM Polymer)

Dodawanie nukleotydów niezależne od szablonu

Ze względu na aktywność terminalnej transferazy, Multi Taq 2 DNA Polymerase ma tendencję do dodawania rodnika adenozyiny na końcu 3' amplifikowanych fragmentów DNA. Szczyt artefaktu jest o jedną bazę krótszy niż oczekiwano (szczyty -1 bp). Wszystkie startery BIOTYPE są przystosowane do minimalizowania tych artefaktów. Powstawanie artefaktów jest dalej ograniczane przez opcjonalne przedłużenie końcowego kroku wydłużenia protokołu PCR przy 68 °C na 60 min. Wysokość szczytu artefaktu jest powiązana z liczbą cDNA. Laboratoria powinny definiować indywidualne limity do analizy szczytów.

Artefakty

Temperatura pomieszczenia może wpływać na skuteczność produktów PCR na instrumentach wielokapilarowych i występują szczyty dzielone lub szczyty boczne. Ponadto w niektórych przypadkach możliwy jest wpływ na automatyczne przypisanie. Jeśli wystąpią te efekty zalecamy wtryśnięcie próbki ponownie przy wyższej temperaturze pomieszczenia. Zawsze należy rozważyć stosowanie świeżych materiałów eksploatacyjnych zgodnie z zaleceniami producenta.

Wpływ polimerów

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit zatwierdzono i certyfikowano dla analizy z POP-4TM polymer. Stosowanie innych polimerów (jak POP-7TM lub POP-1TM) zostało zweryfikowane, ale może wpływać na zachowanie cyklu specyficznych produktów PCR. Ponadto mogą wzrosnąć szumy w tle z powodu różnego zachowania wolnych barwników fluorescencyjnych.

Odchyłki pipetowania

Analiza solidności Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit wykazała, że zestaw jest wytrzymały na niewielkie odchyłki od opisanego protokołu

(odchyłka +/- 10 %). Średnia odchyłka (+/- 20 %) od opisanego protokołu eksperymentalnego może być bardziej krytyczna dla analizy. Kluczowe znaczenie ma zwracanie uwagi na średnie odchyłki -20 % w komponentach PCR, ponieważ znacznie zmniejszają one wysokość sygnału. Najbardziej czułe cele w tym kontekście to KMT2A::MLLT4 i DEK::NUP214.

Aby zminimalizować wszelkie odchyłki, zalecamy stosowanie skalibrowanych pipet, precyzyjnego pipetowania i dokładnego mieszania.

Niskie szczyty elementu kontrolnego ABL

Wewnętrzny element kontrolny ABL stanowi najdłuższy amplikon Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit i dlatego jest kluczowym markerem kontroli jakości. W przypadku niskiej wysokości szczytu ABL-control jedna z poniższych przyczyn jest najbardziej prawdopodobna:

Wejście szablonu za niskie w reakcji: należy określić stężenie RNA i zwiększyć wejście syntezy cDNA według konieczności.

Fragmentowany RNA, tzn. mniejsze amplikony z celów, mogą być pozytywne, ale brakuje wewnętrznego elementu kontrolnego ABL. Sprawdzić przepływ pracy przygotowania próbki dla zanieczyszczenia RNase. Fragmentacja RNA może występować w zarchiwizowanych materiałach próbki.

Nieskuteczna synteza cDNA: zapewnić zgodność z instrukcjami producenta podczas syntezy cDNA. Stosować jedynie zatwierdzone zestawy syntezy cDNA zgodnie z opisem w rozdziale Transkrypcja do cDNA.

Próbka jest naruszana przez aktywny enzym odwrotnej transkryptazy: zapewnić przestrzeganie instrukcji producenta ze specjalnym odniesieniem do kroku inaktywacji cieplnej podczas syntezy cDNA.

Dodatkowe amplikony lub podwójnie pozytywne

W przypadku większości próbek pacjenta oczekuje się wykazania negatywnego wyniku lub pozytywnego wyniku dla jednej translokacji. Więcej niż jedna translokacja jest nietypowym wynikiem i może wymagać dalszej weryfikacji. Jednak niektóre kombinacje zostały zaobserwowane w próbkach pacjenta przed tym w następujący sposób:

Docelowy BCR::ABL_b2a3 może pojawić się ze względnie niską wysokością szczytową, jeśli występuje silna amplifikacja dla ABL-control lub innego

wariantu transkrypcyjnego BCR::ABL (około 5-10 % głównego wyniku docelowego).

Wiadomo, że KMT2A partial tandem domain (KMT2A-PTD) występuje jednocześnie z innymi translokacjami i w złożonych przegrupowaniach, jakie mogą być pozytywne dla więcej niż jednego wariantu KMT2A-PTD.

W przypadku stosowania POP7TM-Polymer translokacja CBFB::MYH11_Type A może powodować niespecyficzny sygnał dla RUNX1::RUNX1T1 i CBFB::MYH11_Type F. Szczyt RUNX1::RUNX1T1 jest przypisywany jako poza drabiną podczas stosowania polimeru POP4 i może zostać zweryfikowany z wykorzystaniem wiersza komórki ME-1. Oba niespecyficzne szczyty boczne wykazują niską wysokość szczytu RFU w porównaniu z CBFB::MYH11_Type A. W przypadku stosowania POP7TM-Polymer niespecyficzny szczyt poza drabiną może być przypisywany jako translokacja CBFB::MYH11_Type I z wysokościami szczytu poniżej 2000 RFU.

Docelowy KMT2A::MLLT4 pojawia się z dwoma różnymi długościami amplikonu, w zależności od konkretnej częstości występowania próbki wariantów transkrypcyjnych. Większość próbek pacjenta wykazuje amplikony z różnicą długości trzech nukleotydów jako szczyt podwójny w pojemniku docelowym KMT2A::MLLT4. Jest to prawidłowy wynik, nie są konieczne działania korekcyjne.

Dowolna translokacja KMT2A może wystąpić z punktem przełamania w egzonie 9 (najczęściej) lub egzonie 10 i 11 (rzadko). Każdy silny szczyt poza drabiną w kanale zielonym może pochodzić z nietypowej translokacji KMT2A i może być weryfikowany innymi metodami.

Docelowy wariant transkrypcyjny KMT2A::MLLT3 6A może wytwarzać dwa wykrywalne amplikony w przypadku bardzo wysokiego wejścia i bardzo wysokiej jakości RNA, powiązane szczyty to 6A_S (short, wymagane) i 6A_L (long, opcjonalne). Jest to konieczne zjawisko właściwe w konstrukcji startera Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit. Jest to prawidłowy wynik, nie są konieczne działania korekcyjne.

Szczyt poza drabiną w kanale żółtym między pojemnikami PML::RARA_bcr1 i bcr3 najprawdopodobniej jest spowodowany przez wariant

PML::RARA_bcr2. Ten cel ma kilka punktów przełamania w egzonie 6 PML i dlatego nie może zostać przypisany z żadnymi specyficznymi pojemnikami.

Ocena skuteczności

Czułość analityczna

Typ próbki Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit jest definiowany jako cDNA transkrybowany z RNA komórkowego wyizolowanego z krwi pełnej żyłnej peryferyjnej lub aspiratu szpiku kostnego. W przypadku próbek krwi RNA w zakresie od 50 ng do 1000 ng możliwy jest pomiar z dostateczną wysokością szczytu elementu kontrolnego ABL stosowanego podczas tej zatwierdzonej oceny skuteczności cDNA synthesis kits SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) i High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Zakładając wydajność transkrypcji 100 %, skutkuje to zakresem stężenia cDNA 2,5 ng/μL do 50 ng/μL; 1 μL cDNA stosuje się w reakcji PCR. W przypadku próbek szpiku kostnego RNA w zakresie od 50 ng do 1000 ng przy zastosowaniu using the SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) i od 100 ng do 1000 ng przy zastosowaniu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) możliwy jest pomiar z dostateczną wysokością szczytu elementu kontrolnego ABL. Zakładając wydajność transkrypcji 100 %, skutkuje to zakresem stężenia cDNA 2,5 ng/μL odpowiednio 5 ng/μL do 50 ng/μL; 1 μL cDNA stosuje się w reakcji PCR. Optymalne wejście RNA jest definiowane jako 1000 ng dla próbki pełnej krwi peryferyjnej i 500 ng dla próbki szpiku kostnego. W przypadku próbek ze słabym stężeniem RNA lub krytycznych celów wejście cDNA w PCR może wzrosnąć do 4 μL dla cDNA transkrybowanego z High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), bez względu na typ próbki. Dla cDNA transkrybowane z SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) wejście cDNA jest ograniczone do maksymalnie 2 μL.

Limit of Blank (LoB) przetestowano na 12 próbkach z różnym pochodzeniem przy zdefiniowanej wcześniej optymalnej ilości wejściowej. Ponieważ nie wykryto niespecyficznych szczytów powyżej wartości progowej wysokości

szczytu 400 RFU w zakresie 55 bp do 550 bp w każdej z 12 przetestowanych próbek, można ustawić wartość progową 400 RFU.

Limit of Detection (LoD) z Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit przetestowany z 6 sztucznymi próbkami z podstawą cDNA, co obejmuje wszystkie pary starterów w mieszance startera z parami startera wykrywającymi więcej niż jeden cel, amplifikując najdłużej i dlatego najtrudniej wykrywany docelowy wariant transkrypcyjny.

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit wykazał akceptowalny limit wykrywania zgodnie z kryteriami akceptacji z maksymalnym LoD 400 kopii dla przetestowanych celów (patrz [Tabela 13](#)), z wyjątkiem KMT2A::MLLT4, który nadal wykazuje akceptowalny wynik z LoD 1000 kopii. Ponieważ nie wszystkie warianty transkrypcyjne wykrywanych fuzji genów mogą być testowane, ogólny LoD 1000 kopii, który był najwyższym wynikiem przetestowanych celów, uznaje się jako bezpieczny do zastosowania.

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

Próbka	Cel	LoD [kopie]
Próbka 1	CBFB::MYH11_TypeJ	200
	BCR::ABL_e1a2	200
	CBFB::MYH11_TypeB	200
	KMT2A-PTD_e11e3	200
	PML::RARA_bcr1	400
Próbka 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
Próbka 3	CBFB::MYH11_TypeG	200
	BCR::ABL_b2a3	100
	CBFB::MYH11_TypeE	200
	KMT2A::ELL_e10e3	100
Próbka 4	CBFB::MYH11_TypeI	200

Próbka	Cel	LoD [kopie]
	MLLT10_240::PICALM_2092	200
	RUNX1::RUNX1T1	400
	DEK::NUP214	200
Próbka 5	KMT2A::MLLT4 (short)	1000
Próbka 6	KMT2A::MLLT4 (short)	500
	KMT2A::MLLT4 (long)	500

Ponieważ Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit jest jakościowym testem przystosowanym do określania obecności lub nieobecności analitu docelowego, testowania Limit of Quantitation (LoQ) nie uznaje się za właściwe dla przeznaczenia.

Specyfika analityczna

Przetestowaliśmy automatyczne wywoływanie alleli z drabinką alleliczną i zgodność przyporządkowania alleli w porównaniu do sztucznych próbek celów translokacji z wykorzystaniem GeneMapper™ ID-X software. Na podstawie wyników zdefiniowano właściwe dla testu ustawienia urządzenia dla genotypizacji za pomocą kapilarnej elektroforezy żelowej (bins i panels) w Genetic Analyzer.

StarteryPCR są przystosowane do wiązania komplementarnego z oficjalną referencyjną sekwencją DNA genomu ludzkiego. Warianty genetyczne, takie jak Single Nucleotide Polymorphism (SNPs, INDELs lub usunięcia), mogą wpływać na specyficzne wiązanie startera i zostały ocenione przez wpisy dbSNP właściwe dla Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit. Jeden wpis (rs73504425) powoduje utratę funkcji startera. Allel wariantowy występuje u 0,6 % populacji afrykańskiej i znajduje się w miejscu wiązania startera dla PICALM::MLLT10, rzadko zgłaszanego genu fuzyjnego z częstością występowania <1 %.

Ponadto przeprowadzono wyszukiwanie BLAST na transkryptomie ludzkim dla Mentype® AMLplex^{QS} Primer mix i nie uzyskano specyficznych produktów amplifikacji w zakresie 0 – 600 bp.

Dokładność i prawdziwość

Dokładność analityczna Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit opiera się na wynikach badań prawdziwości zestawu. BIOTYPE GmbH aktywnie uczestniczy w programie External Quality Assessment (EQA) od 2013. Obecność lub nieobecność translokacji w próbkach jest określona przez zgodność wyników wszystkich uczestników tej EQA. Od 2013 roku przeanalizowano łącznie 68 próbek.

Na podstawie tych wyników utworzono schemat ewentualności w oparciu o porównanie wyników Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit (pozytywne/negatywne) i prawdziwych wyników (pozytywne/negatywne), potwierdzone przez konsensus wszystkich uczestników External Quality Assessment program. Zgodnie z CLSI EP12 (3. edycja) kluczowe wskaźniki skuteczności widoczne w Tabela 14 zostały obliczone na podstawie schematu ewentualności.

Tabela 14 Charakterystyka analityczna Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit.

Charakterystyka analityczna	Szacunek	Dolny przedział ufności 95 %	Górny przedział ufności 95 %
Czułość analityczna	92,2 %	81,5 %	96,9 %
Specyfika analityczna	94,1 %	73,0 %	99,0 %
Pozytywna wartość predykcyjna	97,9 %	89,1 %	99,6 %
Negatywna wartość predykcyjna	80,0 %	58,4 %	91,9 %
Dokładność	92,6 %	83,9 %	96,8 %

Te obliczenia stanowią kompleksowy środek możliwości Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit do prawidłowego klasyfikowania przypadków pozytywnych i negatywnych z prawdopodobieństwem odpowiednio 92 % i 94 %. Ogólna proporcja prawidłowych wyników wynosi 93 %, wykazując wysoką niezawodność. Mentype® AMLplex^{QS} PCR

Amplification Kit wykazuje wysoką skuteczność analityczną, potwierdzając efektywność i niezawodność testu.

Precyzja

Oceniliśmy powtarzalność i odtwarzalność testu na podstawie ISO 5725-2:2022-05 i CLSI EP05 (3. edycja). Pięć sztucznych próbek i Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control oceniono w badaniu wielomiejscowym 5 x 5 x 3 (dzień x powielenie x miejsce). Badanie wielomiejscowe sprawdza główne źródło wariantów (powtarzalność i odtwarzalność) ze względu na różne badane miejsca, które wykażą różne pomiary operatora w różnych miejscach z wykorzystaniem różnych instrumentów. Wynikowa powtarzalność w zakresie od 8,3 %CV do 15,6 %CV i odtwarzalność w zakresie od 14,6 %CV do 30,5 %CV. Ogólnie Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit wskazuje akceptowalną precyzję z $SD_{Rep} \leq 2500$ RFU dla wszystkich specyficznych fuzji genów przetestowanych z próbkami sztucznymi od 1 do 5 i dla Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control.

Punkt graniczny testu

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit wykorzystuje wykrywanie jakościowe fuzji genów przez punkt końcowy PCR. W związku z tym jednym z właściwych punktów granicznych dla testu jest minimalna wysokość szczytu do bezpiecznego rozróżniania między technicznym szumem w tle i typowym wykrywaniem celu. Punkt graniczny wysokości szczytowej RFU został określony przy 400 RFU z danymi z analitycznego testowania czułości.

Elementy zakłócające i reakcje krzyżowe

Potencjalne elementy zakłócające, które mogą wpływać na wyniki procedury pomiarowej, zostały ocenione zgodnie z zaleceniami wytycznych CLSI EP07 (3. edycja) i EP37 (1. edycja). Dla Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit określono endogenne i egzogenne elementy zakłócające, przetestowano ich maksymalne oczekiwane stężenie (C_{max}) w reakcji PCR, zgodnie z sugestią w wytycznych i w przypadku stwierdzenia zakłóceń przetestowane kolejne stężenia, aby ustalić stężenie, przy którym zakłócenie nie jest wykrywane.

Wyniki wykazały brak efektu zakłócenia DNA endogennego elementu zakłócającego przetestowanego przy 1 ng w reakcji PCR, gdy trawienie DNA zostało przeprowadzone jako część przetwarzania próbki.

W przypadku krwi zakłócającej endogennej efekt zakłócenia został zaobserwowany przy obliczonym $C_{\max}$ 0,87 % v/v w reakcji PCR, dalsze rozcieńczenie było testowane do czasu, aż nie wykrywano zakłóceń. 0,087 % v/v krwi nie wykazywało zakłóceń. Jednak zanieczyszczenie krwi można wykryć wzrokowo w reakcji PCR lub w izolowanej zawieszynie RNA przez zmianę koloru pomarańczowego. W przypadku zauważenia zmiany koloru zalecane jest powtórzenie izolacji RNA, aby uniknąć potencjalnych zakłóceń.

W przypadku elementów zakłócających egzogennych DTT, RNase Inhibitor, DNase, Ethanol, Metoclopramide, EDTA, Hydroxyurea i Citrate nie stwierdzono efektu zakłóceń przy właściwym $C_{\max}$, gdzie odchyłki od nieprzetworzonej grupy stwierdzone dla testowanych próbek mieściły się w akceptowanych limitach.

W przypadku elementów zakłócających egzogennych stwierdzono zakłócenie odwrotnej transkryptazy, heparyny u proteinazy K przy właściwym obliczonym $C_{\max}$ lub zalecanym przez CLSI EP37 (1. edycja), dalsze rozcieńczenie było testowane do czasu, aż nie wykrywano zakłóceń. W przypadku odwrotnej transkryptazy enzymu przetestowany $C_{\max}$ 0,2 % v/v wykazywał zakłócenia, chyba że enzym był inaktywowany cieplnie zgodnie z instrukcjami producentów testowanych zestawów syntezy cDNA. Dla heparyny 3,3 U/dL i dla enzymu proteinazy K 0,0001 % v/v nie wykazano zakłóceń.

Antykoagulanty krwi EDTA, cytrynian sodu i heparyna zostały dodatkowo przetestowane z zalecanymi zestawami izolacyjnymi. Nie wykryto wpływu na skuteczność analityczną. Przypuszczamy, że przebieg pracy zestawów izolacyjnych skutecznie usuwanie wszelkie testowane substancje zakłócające pochodzące od antykoagulantów i odczynników izolacyjnych RNA.

Tabela 15 Przetestowane niezakłócające stężenia elementów zakłócających endogennych i egzogennych.

Typ elementu zakłócającego	Kategoria	Element zakłócający	Przetestowane stężenie niezakłócające
Endogenny	Komponenty pełnej krwi	Pełna krew	0,087 % v/v w reakcji PCR
Egzogenny	Antykoagulanty	EDTA	0,099 mg/dL
		Cytrynian	0,004 % v/v w reakcji PCR
		Heparyna	3,3 U/dL
	Odczynniki izolacyjne RNA	Proteinase K	0,0001 % v/v w reakcji PCR
		Etanol	0,3 % v/v w reakcji PCR
		DNase	0,16 % v/v w reakcji PCR
	Odczynniki odwrotnej transkrypcji cDNA	DTT	0,2 % v/v w reakcji PCR
		RNase Inhibitor	0,2 % v/v w reakcji PCR
		Odwrotna transkryptaza	0,2 % v/v w reakcji PCR (inaktywowana ciepłnie)
	Środek przeciwwymiotny	Metoclopramide	0,225 mg/dL
	Środek przeciwnowotworowy	Hydroxyurea	3,08 mg/dL

Stabilność w użyciu

Wszystkie badania stabilności zostały zaplanowane zgodnie z wytycznymi ISO 23640:2015 i CLSI EP25-(2. edycja). Poniższa procedura została przeprowadzona dla wszystkich badań stabilności: Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit przetestowano w różnym czasie przez różny czas trwania. Przeanalizowano sztuczne próbki i Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control. Końcowa ocena różnych stanów uwzględniała porównanie między środkami w czasie rozpoczęcia (T₀) i późniejszych punktach czasu (T_n) i została obliczona z wykorzystaniem poniższego równania:

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

Dla badania stabilności w użyciu przeprowadzono dwa eksperymenty. Jeden do testowania stabilności po kilku cyklach zamrażania i rozmrażania oraz jeden w celu przetestowania stabilności zestawów w trakcie symulowanego użycia po otwarciu jako część badania stabilności zamrażania i rozmrażania oraz deklarowanej długości przechowywania.

Na podstawie wyników Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit jest stabilny przez maksymalnie 20 cykli zamrażania i rozmrażania i może być stosowany do 24 miesięcy po otwarciu.

Dane skuteczności klinicznej

Konstrukcja badania, aspekty etyczne i regulacyjne

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit i metody referencyjne zostały przetestowane na 297 próbkach pacjentów i 10 zdrowych wolontariuszach. Celem tego badania było uzyskanie dowodu klinicznego zgodnie z §§20 do 24 ustawy w sprawie wyrobów medycznych 'Medizinproduktegesetz'. Przy zastosowaniu referencyjnych metod cytogenetycznych (FISH) i/lub wewnętrznego zatwierdzonego qPCR monopleksowego, należy potwierdzić zgodność z urzędzeniem. Potwierdzenie odpowiedzialnej komisji etyki uzyskano dnia 06.06.2012.

Metody referencyjne

Głównym celem jest określenie czułości diagnostycznej i specyfiki w porównaniu do metod referencyjnych. W ramach metody referencyjnej przeprowadzono znormalizowaną Fluorescence-In-Situ-Hybridization (FISH) dla niektórych translokacji [Grimwade et al. Blood 116: 354-65, 2010]. Translokacje nieadresowane przez cytogenikę zostały przetestowane w testach monoplex-nested-PCR opracowanych i zatwierdzonych w laboratorium testowym [Steudel et al. Genes Chromosomes Cancer 37: 237-51, 2003, van Dongen et al. Leukemia 13: 1901-28, 1999].

Ekstrakcja i oczyszczanie RNA

Komórki jednojądrzaste (MNC) zostały pobrane z próbek z wirowaniem frakcjonującym. Następnie wykonano całkowitą izolację RNA i transkrypcję odwrotną do cDNA za pomocą komercyjnie dostępnych zestawów. Jakość

cDNA została przeanalizowana w czasie rzeczywistym PCR. Zatwierdzone pojedyncze testy PCR służyły do potwierdzenia genów fuzyjnych i mutacji.

Wyniki

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit nie wykazał fałszywie pozytywnych wyników z testowanym cDNA 10 zdrowych wolontariuszy.

Spośród 297 przetestowanych próbek pacjentów, 5 nie udało się ocenić z powodu wykrycia wewnętrznego elementu kontrolnego ABL poniżej zalecanej wartości progowej. Z pozostałych 292 próbek 201 wykazało prawdziwie negatywne wyniki w porównaniu do metod referencyjnych.

Indywidualne wyniki testów porównawczych są zebrane w Tabela 16. Fuzje genów PICALM::MLLT10 (CALM-AF10) i KMT2A::MLLT4 (MLL-AF6) nie mogły zostać ocenione w odniesieniu do czułości diagnostycznej, ponieważ nie było dostępnych pozytywnych próbek wstępnie scharakteryzowanych.

Ogólnie uzyskano czułość diagnostyczną 94 % i specyfikę diagnostyczną 99,5 %.

Tabela 16 Wnioski wyników danych skuteczności klinicznej Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit. *Dane częstości występowania są cytowane z Grimwade et al. 2010. b.o. = bez oceny

Biomarker			Ocena skuteczności klinicznej (n=292)						Specyfika diagnostyczna [%]
Fuzja genów	Chrom. aberracja	Wariant	Cz.* [%]	Prawdziwie pozytywny	Prawdziwie negatywny	Fałszywie pozytywny	Fałszywie negatywny	Czułość diagnostyczna [%]	
RUNX1::RUNX1T1	t(8;21) (q22;q22)	n. b.	7	16	275	0	1	94,1	100,0
BCR::ABL	t(9;22)	e1a3	1	1	291	0	0	100,0	100,0
	(q34;q11)	e1a2							
		b3a2							
		b3a3							
		b2a2							
		b2a3							
PICALM::MLLT10	t(10;11) (p13;q14)	MLLT10_240-PICALM_1987	1	0	292	0	0	b.o.	100,0
		MLLT10_240-PICALM_2092							
CBFB::MYH11	odw(16)	Typ A	5	28	262	0	2	93,3	100,0

	(p13;q22)	Typ B							
		Typ C							
		Typ D							
		Typ E							
		Typ F							
		Typ G							
		Typ H							
		Typ J							
DEK::NUP214	t(6;9)(p23;q34)	n. b.	1	3	289	0	0	100,0	100,0
KMT2A::MLLT4	t(6;11)(q27;q23)	n. b.	<0,5	0	292	0	0	b.o.	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	Częściowy	e9e3	5-7	23	269	0	0	100,0	100,0
	Podwójny	e10e3							
	Duplikacja	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							
Podsumowanie			37	85	S	1	5	94,4	99,5

Ocena diagnostyczna

Charakterystyka skuteczności klinicznej Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit wykazała akceptowalne wyniki. Parametry dla oceny skuteczności klinicznej zostały obliczone zgodnie z załącznikiem I, cz. 9.1b IVDR (UE) 2017/746 jak pokazano w Tabela 17.

Tabela 17 Charakterystyka diagnostyczna Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit

Charakterystyka diagnostyczna	Szacunek	Dolny przedział ufności	Górny przedział ufności
Czułość diagnostyczna	94,4 %	87,7 %	97,6 %
Specyfika diagnostyczna	99,5 %	97,3 %	99,9 %
Pozytywna wartość predykcyjna	98,8 %	93,7 %	99,8 %
Negatywna wartość predykcyjna	97,6 %	94,4 %	99,0 %
Dokładność diagnostyki	98,0 %	95,6 %	99,1 %

Kontrola jakości

Wszystkie komponenty zestawu przechodzą przez intensywny proces zapewnienia jakości w BIOTYPE GmbH. Jakość zestawów testowych jest stale monitorowana, aby zapewnić nieograniczoną użyteczność. W razie pytań dotyczących zapewnienia jakości prosimy o kontakt.

Pomoc techniczna

W kwestiach pomocy technicznej należy kontaktować się z naszym zespołem obsługi klienta:

e-mail: support@biotype.de

telefon: +49 (0)351 8838 400

Referencje

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.

Ograniczenia stosowania

- Procedury w tym podręczniku muszą być przestrzegane zgodnie z opisem. Wszelkie odchyłki mogą skutkować błędami w teście lub powodować błędne wyniki.
- Stosowanie tego produktu jest ograniczone dla profesjonalnych użytkowników laboratoriów, specjalnie przeszkolonych w zakresie technik PCR i kapilarnej elektroforezy żelowej.
- Odpowiednie procedury pobierania, transportowania, przechowywania i przetwarzania próbek są wymagane dla optymalnej skuteczności tego testu.

- Tego testu nie wolno stosować bezpośrednio na próbce. Odpowiednie metody ekstrakcji kwasu nukleinowego zostały zastosowane przed wykorzystaniem tego testu.
- Zestaw został zatwierdzony tylko do zastosowania z odczynnikami, instrumentami i oprogramowaniem opisanymi w rozdziale Materiały i urządzenia wymagane, ale niedostarczone
- Mentype® AMLplex^{QS} zaprojektowano, zatwierdzono i certyfikowano jako narzędzie kontrolne dla klasyfikacji podtypu AML. To zastosowanie nie jest przeznaczone do kwantyfikowania liczby kopii, jak monitoring Minimal Residual Disease (MRD) lub zatwierdzania innych podtypów białaczek lub AML pediatrycznej.
- Ze względu na zmienność genetyczną, single nucleotide polymorphism (SNPs) lub krótki insertion deletion polymorphism (INDELs) może wpływać na wydajność startera lub dostępność szablonu. Analiza najnowszej wersji zespołu genomu ludzkiego (HG38) dla wszystkich grup etnicznych wykazała tylko jeden krytyczny SNP, powodujący utratę funkcji startera. Allel wariantowy występuje u 0,6 % populacji afrykańskiej i znajduje się w miejscu wiązania startera dla PICALM::MLLT10, rzadko zgłaszanego genu fuzyjnego z częstością występowania <1 %. Jednak ze względu na niewielką częstość występowania fuzji genów w powiązaniu z niewielkim prawdopodobieństwem występowania SNP w populacji światowej, ryzyko wyników fałszywie negatywnych jest niskie. W razie niepewności należy rozważyć potwierdzanie wyników metodami referencyjnymi.
- Dobre praktyki laboratoryjne są wymagane dla zapewnienia skuteczności zestawu.
- Wyniki muszą być interpretowane przez przeszkolonego pracownika służby zdrowia.
- Interpretacja wyników musi obejmować możliwość wyników fałszywie negatywnych i fałszywie pozytywnych.
- Nie używać komponentów, których ważność upłynęła lub nieprawidłowo przechowywanych

Informacje o zamawianiu

Zamówienia należy składać drogą mailową na adres sales@biotype.de.

Produkt	Rozmiar opakowania	Numer zamówienia
Mentype® AMLplex ^{QS} PCR Amplification Kit	25 reakcji	45-12100-0025
	100 reakcji	45-12100-0100
	400 reakcji	45-12100-0400
Matrix Standard BT5 multi	1 x 25 µL	45-15100-0025
	2 x 25 µL	45-15100-0050

Znaki towarowe i zastrzeżenia

Mentype® to zarejestrowany znak towarowy BIOTYPE GmbH.

Inne znaki towarowe: ABI PRISM®, GeneMapper®, GeneAmp® i Applied Biosystems® (Applied Biosystems LLC group); QIAamp® (Qiagen); POP-4™, POP-1™, POP-7™ (Europe: Applied Biosystems LLC, US: Life Technologies Corporation). PCR jest objęty patentem. Właścicielami patentu są Hoffmann-La Roche Inc. i F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Zarejestrowane nazwy, znaki towarowe itd. stosowane w tym dokumencie, nawet jeśli nie zostały konkretnie oznaczone jako takie, nie mogą być traktowane jako niechronione przez prawo.

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit do zestaw diagnostyczny ze znakiem CE zgodnie z europejskim rozporządzeniem w sprawie diagnostyki in vitro (UE) 2017/746.

Produkt nie jest licencjonowany w Health Canada i nie został zaakceptowany ani zatwierdzony przez FDA.

Niedostępny we wszystkich krajach.

© 2025 BIOTYPE GmbH; wszelkie prawa zastrzeżone.

Objaśnienie symboli



Producent



Kod partii



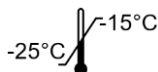
Zawiera dostateczne odczynniki do testów <N>



Zapoznać się z elektroniczną instrukcją obsługi (eIFU)



Data przydatności



Limit temperatury



Numer katalogowy



Wyrób medyczny do zastosowań w diagnostyce in vitro



Nie narażać na działanie światła słonecznego



Przechowywać w suchym miejscu



Unique device identifier

Inne oznaczenia użyte w niniejszej instrukcji obsługi:



Przydatne porady



Uwaga, należy koniecznie przestrzegać niniejszej informacji!

niebieski podkreślony tekst

Łączy kierujące do treści zewnętrznych, jak strony główne, adresy e-mail

czarny podkreślony tekst

Łączy krzyżowe w dokumencie, ułatwiające nawigację

tekst z akapitem, kursywą, pogrubiony

Pola, które należy klikać w oprogramowaniu

Załącznik

Lista genów docelowych

Gen	Alternatywne nazwy	ID transkrypcji
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

Elektroferogramy próbek referencyjnych

Na kolejnych stronach znajdują się przykłady elektroferogramów _Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder (Rysunek 2), Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control (PC, Rysunek 3) i elementu kontrolnego bez szablону (NTC, Rysunek 4).

Wszystkie próbki były amplifikowane na cyklerze ProFlex PCR i analizowane na 3500 Genetic Analyzer (POP-4, matryca 36 cm) przy zastosowaniu zatwierdzonego parametru cyklu. Analiza danych została przeprowadzona za pomocą GeneMapper ID-X wersja 1.6. Bins, Panels i zastosowano Analysis method zgodnie z Tabela 11.

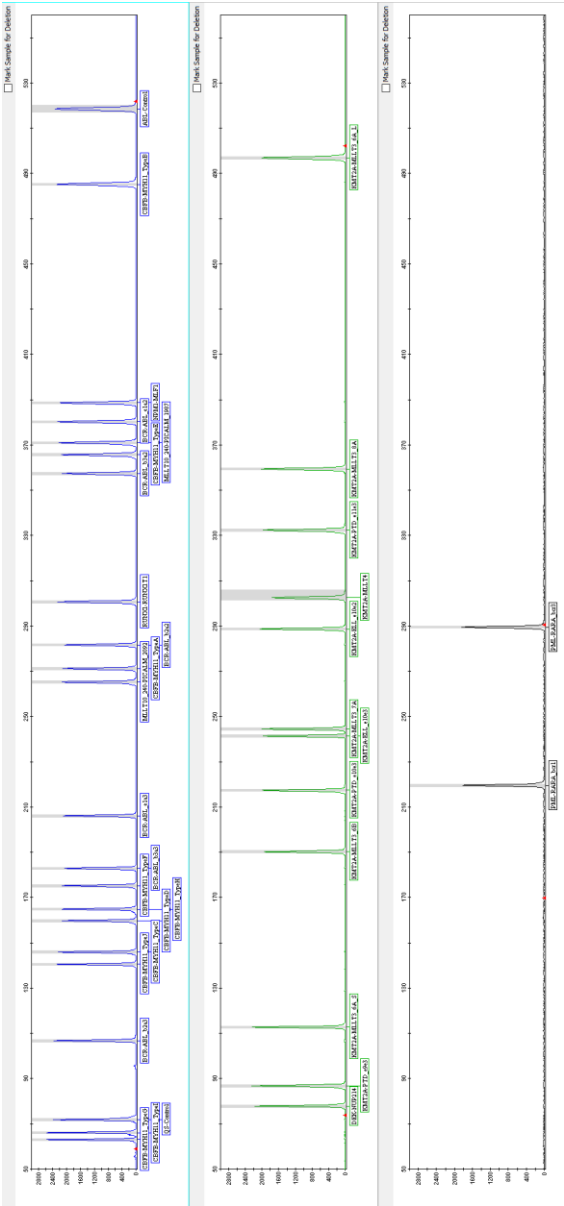
Elektroferogramy są zoomowane do długości fragmentu 50 – 560 bp (oś x). Skalowanie osi y zostało przeprowadzone indywidualnie:

Rysunek 2, strona 57: Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder:
3000 RFU

Rysunek 3, strona 58: Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control:
9000 RFU

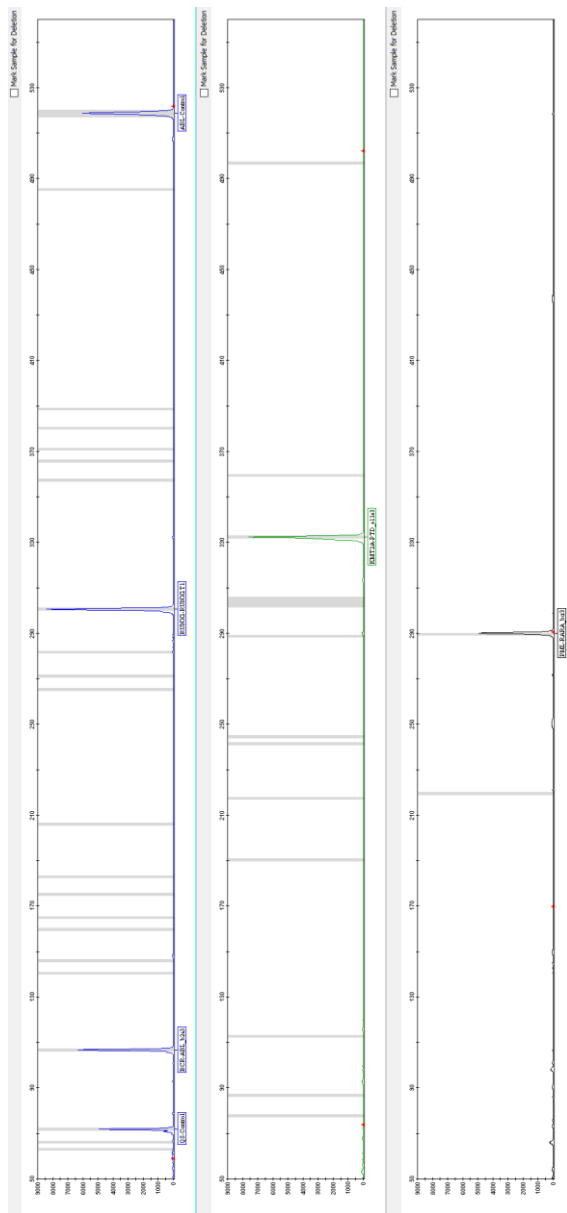
Rysunek 4, strona 59: Element kontrolny bez szablónu (NTC):
9000 RFU

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder



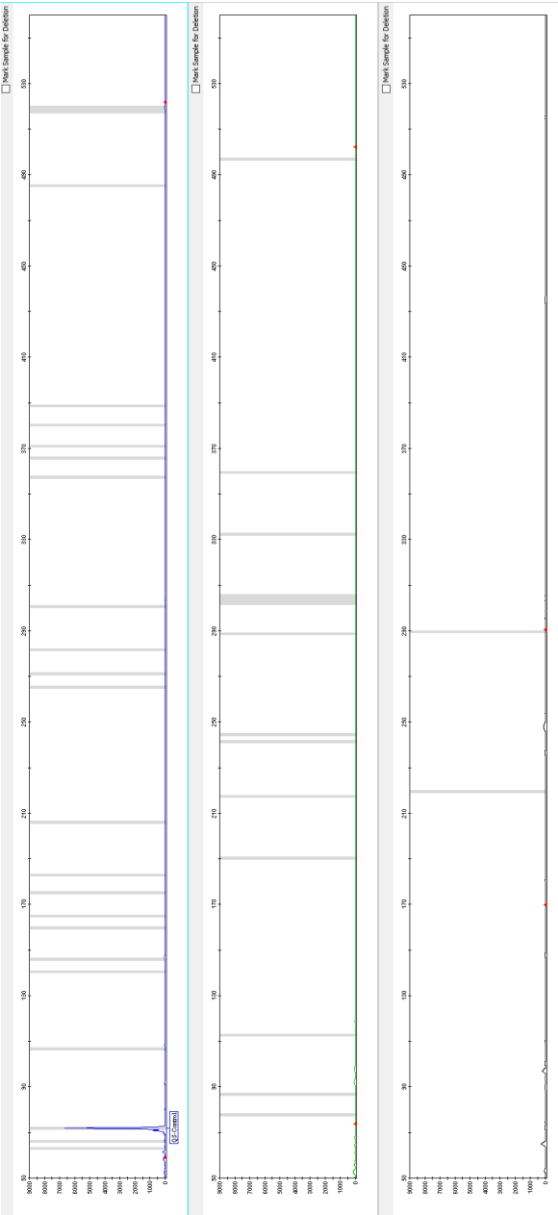
Rysunek 2 Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder

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



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

No template control (NTC)



Rysunek 4 No template control (NTC)

BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Tel.: +49 351 8838 400

Faks: +49 351 8838 403

www.biotype.de

Zamawianie

sales@biotype.de

Dział obsługi i pomocy klienta

support@biotype.de

