

Mentype® AMLplex^{QS}

PCR Amplification Kit

Istruzioni per l'uso (IFU)



0483

Prodotto per diagnostica in vitro

AMLIFU02v2it
23.07.2025



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



Codice lotto



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY
Siro Web: www.biotype.de
Indirizzo e-mail: support@biotype.de
Ordini: sales@biotype.de



Avviso di modifica

Si prega di osservare le seguenti modifiche rispetto alla versione precedente delle istruzioni per l'uso:

Codice documento	Modifiche	Data
AMLIFU02v1it	Versione iniziale	28.05.2025
AMLIFU02v2it	Aggiornamento tabella 8	23.07.2025

Una versione stampata di queste IFU può essere ricevuta gratuitamente entro 7 giorni.

**In caso di domande o richieste, contattarci
al numero +49 351 8838 400 o all'indirizzo support@biotype.de**

Indice

Scopo d'uso previsto	4
Background scientifico	4
Descrizione del prodotto.....	5
Materiali forniti	7
Descrizione dei componenti	8
Conservazione e manipolazione dei reagenti	9
Materiali e dispositivi necessari, ma non forniti.....	9
Attrezzature di laboratorio generali	9
Reagenti, kit e materiali di consumo	10
Strumenti e software	11
Campioni e campioni di prova	13
Avvertenze e precauzioni.....	13
Avviso all'utente	14
Procedura	15
Panoramica del flusso di lavoro sperimentale	15
Preparazione del campione	15
Preparazione del controllo	19
Preparazione della miscela master	19
Amplificazione della PCR.....	22
Elettroforesi su gel capillare.....	23
Preparazione dei prodotti PCR	23
Analisi della lunghezza del frammento	25
Analisi dei dati.....	27
Procedura generale per l'analisi dei dati	27
Analisi del campione	30
Analisi dei dati con GeneMapper™ ID-X.....	33

Risoluzione dei problemi	36
Valutazione delle prestazioni.....	39
Sensibilità analitica.....	39
Specificità analitica.....	41
Accuratezza ed esattezza	42
Precisione.....	43
Valore cut-off del test	43
Interferenti e reazioni incrociate	44
Stabilità in uso	46
Dati sulle prestazioni cliniche	46
Valutazione diagnostica	49
Controllo della qualità	49
Assistenza tecnica.....	49
Riferimenti	50
Limitazioni d'uso.....	50
Informazioni sugli ordini	52
Marchi e dichiarazioni di non responsabilità	52
Spiegazione dei simboli	53
Appendice.....	55

Scopo d'uso previsto

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit è un test manuale destinato allo screening qualitativo di 11 fusioni geniche con un totale di 34 varianti di trascrizione, che consente di identificare aberrazioni cromosomiche di rilevanza diagnostica, prognostica e terapeutica in pazienti adulti con diagnosi certa o sospetta di leucemia mieloide acuta (AML).

Il test deve essere utilizzato con DNA (cDNA) complementare, con trascrizione inversa da RNA cellulare estratto da campioni di sangue intero venoso periferico o di midollo osseo.

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit è utilizzato per rilevare aberrazioni cromosomiche nell'ambito di decisioni cliniche pertinenti alla leucemia mieloide acuta. L'identificazione delle traslocazioni genetiche specifiche consente di classificare le malattie leucemiche e fornisce informazioni essenziali in merito alla diagnosi per determinare la terapia basata sul rischio dei pazienti.

Il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit è destinato a personale professionale di laboratorio esperto in tecniche di genetica molecolare, PCR multiplex e utilizzo dell'Genetic Analyzer di Thermo Fisher Scientific (divisione Applied Biosystems).

Background scientifico

L'individuazione di aberrazioni cromosomiche specifiche ha un elevato valore prognostico in quasi tutte le tipologie di leucemia acuta. Le evidenze della biologia molecolare relative alle aberrazioni cromosomiche (traslocazioni) rappresentano un importante completamento diagnostico. L'individuazione di traslocazioni specifiche consente di classificare i sottotipi delle malattie leucemiche e fornisce informazioni essenziali per la terapia orientata al rischio dei pazienti.

Il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit favorisce la rilevazione delle più comuni aberrazioni cromosomiche osservate finora nell'AML ed è uno strumento di screening facile da usare e affidabile.

Descrizione del prodotto

Il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit contiene reagenti ottimizzati per la rilevazione ad alta risoluzione di 11 geni di fusione con 34 varianti di trascrizione in totale (vedere [Tabella 1](#)). La denominazione delle varianti segue le nomenclature storicamente consolidate, in particolare per KMT2A (Schnittger et al., 2000). L'elenco completo dei geni, i loro nomi alternativi e gli ID della trascrizione utilizzati per la descrizione sistematica della variante sono riportati nell'appendice (vedere [Elenco geni target](#)).

Il kit di analisi comprende un controllo PCR interno (Quality Sensor “QS-Control”), indipendente dal modello, e un controllo cDNA dipendente dal modello (ABL-Control), che fornisce informazioni utili sull'efficienza della PCR, sulla qualità dei modelli di cDNA applicati e sulla presenza di PCR inibitori.

Il test viene eseguito mediante analisi dei frammenti con elettroforesi su gel capillare. Un primer per ogni trascrizione è marcato in fluorescenza con 6-FAM, BTG o BTY, gli spettri di colore dell'accessorio Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE, GmbH).

Tabella 1 Fusioni geniche e varianti di trascrizione rilevabili con il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit

Fusione del gene	Aberrazione cromosomica	Variante	Descrizione variante sistematica
RUNX1::RUNX1T1	t(8;21) (q22;q22.1)	-	RUNX1:e6::RUNX1T1:e3
BCR::ABL	t(9;22) (q34.1;q11.2)	e1a3	BCR:e1::ABL1:e3
		e1a2	BCR:e1::ABL1:e2
		b3a2	BCR:e14::ABL1:e2
		b3a3	BCR:e14::ABL1:e3
		b2a2	BCR:e13::ABL1:e2
PICALM::MLLT10	t(10;11) (p12.3;q14.2)	b2a3	BCR:e13::ABL1:e3
		MLLT10_240-PICALM_1987	MLLT10:e3::PICALM:e19
		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

Fusione del gene	Aberrazione cromosomica	Variante	Descrizione variante sistemica
		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

Il test è stato convalidato mediante lo screening della fusione genica di ~ 300 pazienti AML e la sua idoneità è stata confermata in uno studio di valutazione clinica comparativa.

Il limite di rilevazione per la valutazione qualitativa è di 400 RFU. In media è possibile rilevare un minimo di 1000 copie per ogni fusione genica.

L'intervallo di ingresso generale nella reazione di trascrizione inversa, in condizioni standard, è definito da 100 ng a 1 µg totali di RNA isolati da sangue intero o midollo osseo.

L'input ottimale nella trascrizione inversa per il midollo osseo è pari a 500 ng di RNA e 1 µg di RNA per il sangue periferico. 1 µL di cDNA viene quindi utilizzato durante la PCR.

Materiali forniti

Tabella 2 Contenuto del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit

Reagente	Colore del tappo	Volume per dimensioni dell'imballaggio		
		25 reazioni	100 reazioni	400 reazioni
Nuclease-Free Water	Azzurro	1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Viola	125 µL	500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® AMLplex ^{QS} Primer Mix	Rosso	63 µL	250 µL	4 x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Bianco	10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Positive Control	Bianco	25 µL	25 µL	25 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Arancione	13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Allelic Ladder	Verde	25 µL	25 µL	4 x 25 µL

Un riepilogo dei numeri di lotto dei componenti è riportato sull'etichetta posta all'interno della linguetta della scatola.

NOTA

i

Si noti che la dimensione dell'imballaggio descrive il numero di test **senza** tenere conto del numero di controlli richiesti o dell'eccesso necessario per il pipettaggio.

Si raccomanda l'utilizzo delle seguenti dimensioni per il throughput corrispondente:

- < 8 campioni per esecuzione della PCR: Dimensioni dell'imballaggio per 25 reazioni
- 8 - 45 campioni per esecuzione della PCR: Dimensioni dell'imballaggio per 100 reazioni
- < 45 campioni per esecuzione della PCR: Dimensioni dell'imballaggio per 400 reazioni

Descrizione dei componenti

Nuclease-Free Water: PCR, utilizzata nella configurazione della PCR e come controllo no template (NTC).

Tampone **Reaction Mix A:** PCR contenente dNTPs e MgCl₂. Il tampone della PCR viene ottimizzato per promuovere l'attività enzimatica per la PCR.

Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix: miscela di primer oligonucleotidici multiplex contenente primer marcato (6-FAMTM, BTG, BTY) e non marcato.

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

Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control: miscela di DNA artificiale a doppio filamento di cinque frammenti di DNA. Viene utilizzato come controllo esterno qualitativo della PCR, positivo per i seguenti target su tutti e 3 i riquadri: BCR::ABL_b2a3, RUNX1::RUNX1T1, ABL-control, KMT2A-PTD_e11e3 e PML::RARA_bcr3, , inoltre il QS viene amplificato come marcatore di qualità per la validità del campione.

NOTA

i

Il Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control non è critico per il professionista di laboratorio, in quanto è costituito da singole molecole di DNA che sono state purificate, non sono pericolose e non hanno funzioni biologiche attive. Non contiene cellule vive o organismi patogeni che potrebbero costituire una minaccia diretta.

DNA Size Standard 550 (BTO): miscela di frammenti PCR marcati con fluoroforo con lunghezze di frammenti definite comprese tra 60 e 550 bp, il componente viene aggiunto a ciascun prodotto PCR prima dell'analisi della lunghezza del frammento e viene utilizzato per una regressione dimensionale per determinare esattamente la lunghezza del frammento dei prodotti PCR.

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder: miscela di frammenti PCR marcati con fluorofori che rappresentano tutti gli alleli rilevabili del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit. Include 22 frammenti marcati con 6-FAMTM, 12 frammenti marcati con BTG e 2 frammenti marcati con BTY,

utilizzati come riferimento di genotipizzazione per l'identificazione esatta dell'allele.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Il kit viene spedito con ghiaccio secco. I componenti del kit devono arrivare congelati, a eccezione di Multi Taq 2 DNA Polymerase, che è conservato in un tampone che impedisce il congelamento del reagente.

Verificare la completezza del kit al momento della ricezione. Non utilizzare i componenti del kit se risultano scongelati all'arrivo. Se uno o più componenti non sono congelati o se i tubi o l'imballaggio sono stati danneggiati durante la spedizione, le prestazioni non possono essere garantite.

Conservare tutti i componenti a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C, al riparo dalla luce. In particolare, Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix, DNA Size Standard 550 (BTO) e Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder devono essere conservati al riparo dalla luce.

Per prevenire eventuali contaminazioni, si raccomanda di conservare e utilizzare separatamente i componenti di pre-amplificazione (RNA e cDNA, Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control) e i componenti di post-amplificazione (DNA Size Standard 550 (BTO) e Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder) e i reagenti PCR (Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A e Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix).

La scadenza del kit è indicata dall'etichetta della scatola del kit o è pari a 24 mesi dopo l'apertura, in base a quale delle due condizioni si verifica per prima. Non superare un massimo di 20 cicli di congelamento e scongelamento.

Materiali e dispositivi necessari, ma non forniti

Attrezzature di laboratorio generali

- Centrifuga da tavolo con rotore per provette di reazione da 2 mL e 200 µL
- Centrifuga con rotore per piastre per microtitolazione a 96 pozzetti
- Miscelatore vortex

- Pipette calibrate regolabili con puntali filtranti monouso a tenuta di aerosol
- Piastre di reazione da 200 µL a 96 pozzetti o provette di reazione da 200 µL con materiale di chiusura corrispondente, di qualità PCR.
- Rack per provette di reazione da 2 mL e 200 µL
- Rack di raffreddamento per provette da 2 mL
- Guanti monouso senza polvere
- NanoDrop™ One Spectrophotometer o Qubit™ Fluorometer

NOTA**i**

Tutti i materiali utilizzati per la PCR devono essere di qualità adeguata (DNA libero e per biologia molecolare). Assicurarsi che tutti gli strumenti utilizzati siano stati installati, calibrati, verificati e sottoposti a manutenzione secondo le istruzioni e le raccomandazioni del produttore.

Reagenti, kit e materiali di consumo**Tabella 3 Reagenti richiesti, ma non forniti**

Si noti che alcuni reagenti e materiali di consumo sono utilizzati in combinazioni specifiche e non sono tutti necessari per ogni esecuzione.

Reagente	Fornitore	Numero d'ordine
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

Reagente	Fornitore	Numero d'ordine
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

Strumenti e software

Oltre ai metodi di estrazione manuali basati su colonne, come descritto nel capitolo Preparazione del campione, è possibile utilizzare il seguente metodo automatizzato per l'estrazione di RNA:

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

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit è stato convalidato per essere utilizzato con i seguenti termociclatori per PCR:

- ProFlex PCR System (n. cat.: 4484073 (blocco campione 3 x 32 pozzetti), 4484075 (blocco campione da 96 pozzetti); Thermo Fisher Scientific)
- GeneAmp® PCR System 9700 Silver (discontinuo, Thermo Fisher Scientific)
- Mastercycler nexus gradient (n. cat.: 6331000017, Eppendorf AG)
- Mastercycler ep-S (discontinuo, Eppendorf AG)
- Biometra Tadvanced (n. cat.: 846-2-070-211; Analytik Jena)

L'applicazione di termociclatori per PCR diversi da quelli indicati deve essere convalidata dall'utente. Devono essere rispettate le seguenti specifiche:

- Coperchio riscaldato
- Blocco adatto a piastre/provette di reazione da 200 µL
- Ramping regolabile a 4 °C/secondo

Il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit è stato convalidato per essere utilizzato con lo strumento e le impostazioni seguenti:

- Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), versione software 4.0.1
 - POP-4™ Polymer per 3500/3500xL Genetic Analyzer
 - POP-7™ Polymer per 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), versione software 1.2.4

L'analisi dei dati viene eseguita con il software:

- GeneMapper™ ID-X software, versione 1.6 (Thermo Fisher Scientific), utilizzando un prodotto specifico:
 - Analysis Methods: AMLplexIVD_Analysis1_v1x o AMLplexIVD_Analysis4_v1x o AMLplexIVD_Analysis7_v1x
 - Bins: AMLplexIVD_Bins1_v1x o AMLplexIVD_Bins4_v1x o AMLplexIVD_Bins7_v1x
 - Panels: AMLplexIVD_Panel1_v1x o AMLplexIVD_Panel4_v1x o AMLplexIVD_Panel7_v1x
 - Size Standard: BTO_60-550_v1x

Valutazioni manuali dei file fsa o risultati forniti con il software per la raccolta dei dati senza il software descritto per l'analisi e la valutazione dei dati, non saranno convalidati.

NOTA



Assicurarsi che tutti gli strumenti utilizzati siano stati installati, calibrati, verificati e sottoposti a manutenzione secondo le istruzioni e le raccomandazioni del produttore.

Campioni e campioni di prova

I seguenti campioni sono stati convalidati con il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit:

- Campioni di sangue venoso periferico umano (EDTA, citrato, eparina e stabilizzante RNA Exact), conservati a 4 °C e trattati per purificazione dell'RNA entro 24 ore.
- Campioni di midollo osseo (EDTA, eparina), conservati a 4 °C e trattati per purificazione dell'RNA entro 24 ore.

L'RNA ottenuto deve essere conservato non diluito a una temperatura compresa tra -85 °C e -70 °C.

NOTA



Assicurarsi che l'anticoagulante utilizzato per il prelievo di sangue sia compatibile con le istruzioni del produttore del kit di isolamento dell'RNA.

Avvertenze e precauzioni

- Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di utilizzare il prodotto.
- Leggere le schede di dati di sicurezza (SDS) e le dichiarazioni di non pericolosità (NHS) di tutti i prodotti BIOTYPE, disponibili su richiesta o all'indirizzo (www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter). Per i prodotti che non richiedono una SDS, poiché non contengono SVHC o sono soggetti ad altre restrizioni del regolamento 1272/2008 (CLP), BIOTYPE fornisce la SDS su richiesta.
- Contattare i produttori dei materiali e reagenti richiesti ma non forniti, per richiedere copie delle SDS di eventuali reagenti aggiuntivi necessari.
- Non mescolare componenti del kit di lotti diversi.
- Non è consentita l'aliquotazione dei componenti del kit in altri contenitori per reazione.
- L'uso di questo prodotto è limitato agli utenti professionali del laboratorio, formati sulle tecniche di genetica molecolare, su PCR multiplex e sull'uso di Genetic Analyzers della Thermo Fisher Scientific.
- Prima del primo utilizzo, verificare che il prodotto e i suoi componenti presentino le seguenti caratteristiche:

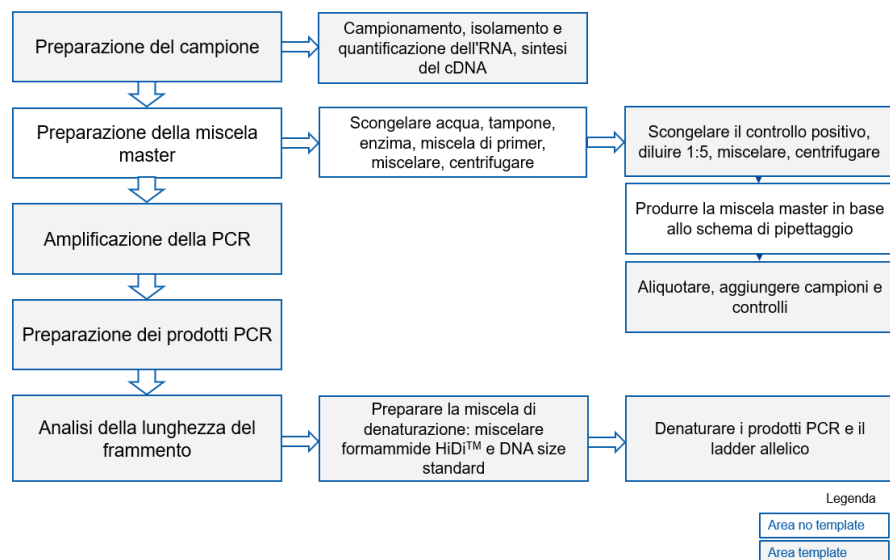
- Integrità
 - Dati completi relativi al numero, alla tipologia e al riempimento (vedi capitolo Materiali forniti)
 - Etichettatura corretta
 - Congelamento all'arrivo (a eccezione di Multi Taq 2 DNA Polymerase)
- I campioni devono sempre essere trattati come infettivi e/o rischio biologico in conformità alle procedure di laboratorio sicure.
 - Non utilizzare i kit se hanno superato la data di scadenza.
 - Smaltire i rifiuti del campione e del test secondo le norme di sicurezza e di smaltimento locali.
 - Tutti gli strumenti utilizzati sono stati installati, calibrati, controllati e mantenuti secondo le istruzioni e le raccomandazioni del produttore.

Avviso all'utente

L'utente è tenuto a segnalare al produttore qualsiasi problema che si verifichi in relazione al prodotto. Eventuali incidenti gravi legati a questo kit devono essere segnalati al produttore e alle autorità competenti degli Stati membri in cui si trova l'utente e/o il paziente. Un riepilogo di sicurezza e prestazioni ((SSP) è stato creato in conformità all'articolo 29 del regolamento (EU) 2017/746 e ha lo scopo di fornire accesso pubblico tramite database EUDAMED a un riepilogo aggiornato dei dati sulla sicurezza e sulle prestazioni del dispositivo agli utenti a cui è destinato (nel caso di questo prodotto solo ai professionisti di laboratorio).

Procedura

Panoramica del flusso di lavoro sperimentale



Preparazione del campione

Requisiti del campione non processato

Il campione del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit è definito come cDNA trascritto da RNA estratto da sangue intero venoso periferico o midollo osseo prelevato da esseri umani.

Raccomandiamo l'uso di reagenti per la stabilizzazione dell'RNA durante la raccolta del campione. Gli stabilizzanti dell'RNA aiutano a preservarne l'integrità (ad esempio S-Monovette RNA Exact). L'isolamento dell'RNA deve essere eseguito tempestivamente dopo la raccolta del campione.

NOTA

i

Una lunga conservazione del materiale del campione non processato può portare a una frammentazione del materiale genetico e quindi a una qualità insufficiente del materiale. Ciò può comportare un peggioramento del risultato dell'analisi, ad esempio attraverso segnali ridotti o controlli interni non validi.

Sangue

Prelevare almeno un campione di 200 µL di sangue intero venoso periferico per la procedura seguente.

La manipolazione del sangue venoso periferico intero deve seguire le raccomandazioni della Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline MM05–A2 (2nd edition), in cui si afferma che il sangue intero può essere conservato a temperatura ambiente (temperatura compresa tra 22 °C e 25 °C) fino a 24 ore, oppure a una temperatura compresa tra 2 °C e 6 °C per almeno 72 ore. Inoltre, si raccomanda che gli anticoagulanti utilizzati per il prelievo del sangue intero siano EDTA, citrato o eparina.

Midollo osseo

Prelevare almeno un campione di 200 µL di midollo osseo per la procedura seguente.

La manipolazione dell'aspirato di midollo osseo deve seguire le raccomandazioni delle CLSI guideline MM05–A2 (2nd edition), in cui si indica che l'aspirato di midollo osseo anticoagulato (EDTA o citrati) deve essere conservato e trasportato a 4°C. Per ottenere risultati ottimali, l'RNA deve essere estratto entro 1- 4 ore dal prelievo.

Estrazione di RNA

Eseguire l'estrazione di RNA e la purificazione da aspirati di sangue intero periferico (PB) o midollo osseo (BM) con uno dei seguenti kit:

- RNeasy® Midi/ Mini/ Plus Mini Kit (Qiagen GmbH) per anticoagulanti EDTA, citrato ed eparina su BM e PB

- NucleoSpin® Dx RNA Blood (Macherey-Nagel) per stabilizzatore RNA Exact su PB
- Maxwell® CSC RNA Blood Kit (Promega) per anticoagulanti EDTA ed eparina su BM

Seguire i manuali e le raccomandazioni del produttore per l'estrazione dell'RNA. Si raccomanda di eseguire una **digestione** di **DNase** durante l'isolamento, secondo le istruzioni del produttore.

NOTA



La contaminazione da sangue può essere rilevata visivamente nella reazione PCR o nel RNA isolato attraverso cambiamenti di colore arancione. Se si osserva un cambiamento di colore, si consiglia di ripetere l'isolamento del RNA per evitare qualsiasi potenziale interferenza.

NOTA



Assicurarsi di eliminare qualsiasi traccia di etanolo prima dell'eluizione dell'acido nucleico. L'etanolo è un forte inibitore della PCR.

Quantificazione e diluizione dell'RNA

Quantificare la concentrazione di RNA mediante spettroscopia UV/VIS a 260 nm utilizzando NanoDrop spectrophotometer o mediante spettroscopia di fluorescenza utilizzando Qubit™ Fluorometer.

Quando si utilizza la spettrofotometria, utilizzare il tampone di eluizione del kit di estrazione del RNA per misurare il valore di bianco. Il rapporto A260/A280 deve essere compreso nell'intervallo 1,9 - 2,1, mentre il rapporto A260/A230 deve essere compreso nell'intervallo 1,8 - 2,3.

Per la quantificazione fluorimetrica dell'RNA, è possibile utilizzare il Qubit™ Fluorometer con i Qubit™ RNA HS Assay-Kit e Qubit™ RNA BR Assay-Kit.

Per utilizzare il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit, diluire i campioni di RNA a una concentrazione adatta per la successiva trascrizione in cDNA. Preparare la diluizione al momento dell'uso. Utilizzare acqua priva di nucleasi come diluente.

NOTA



L'intervallo di ingresso per la trascrizione nel cDNA segue le istruzioni del produttore del kit di trascrizione. L'utilizzo di 100 ng - 1 µg di RNA in un volume di reazione finale di 20 µL per la sintesi di cDNA è convalidato per entrambi i tipi di campione. Si raccomanda di utilizzare un dosaggio ottimale di **500 ng per il midollo osseo e 1 µg per il sangue periferico**.

Conservazione dell'RNA

Conservare i campioni RNA non diluiti in acqua priva di RNase a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C fino a 24 ore o a una temperatura compresa tra -85 °C e -70 °C fino a un anno.

Trascrizione nel cDNA

Eseguire la sintesi del cDNA secondo le istruzioni del produttore, utilizzando uno dei seguenti kit:

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

*raccomandato per una bassa quantità di RNA

NOTA



L'inattivazione termica della trascrittasi inversa è fondamentale per le prestazioni della PCR. Consultare le istruzioni del produttore per maggiori dettagli.

Conservazione del cDNA

Conservare i campioni di cDNA a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C fino a un anno.

Preparazione del controllo

Controllo positivo (PC)

Scongelare il Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control, omogeneizzare agitando delicatamente con il vortex, quindi centrifugare brevemente.

Diluire 1:5 di Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control utilizzando Nuclease-Free Water inclusa nel kit. Ad esempio, mescolare 1 µL del controllo con 4 µL di Nuclease-Free Water.

Omogeneizzare il PC diluito agitando delicatamente con il vortex. Successivamente, centrifugare brevemente il PC diluito (circa 5 secondi).

Non conservare il controllo positivo diluito.

NOTA



Applicare sempre una nuova diluizione di Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control.

Controllo no template (NTC)

Applicare l'acqua priva di nucleasi inclusa nel kit come controllo no template NTC al posto del campione.

Preparazione della miscela master

Rimuovere e scongelare i seguenti componenti dal Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit:

- Nuclease-Free Water (tappo azzurro)
- Reaction Mix A (tappo viola)
- Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix (tappo rosso)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (tappo bianco)

Tutti i componenti congelati devono essere scongelati a temperatura ambiente (temperatura compresa tra 22 °C e 25 °C per circa 30 minuti, al riparo dalla luce) e omogeneizzati capovolgendo le provette, proseguendo con il pipettaggio o agitando delicatamente con il vortex. Successivamente, centrifugare brevemente i reagenti (per circa 5 secondi). Prima della preparazione della miscela master, si raccomanda di conservare la Multi Taq 2 DNA Polymerase in un ambiente raffreddato il più a lungo possibile (ad esempio la griglia di raffreddamento).

NOTA



Miscelare la Multi Taq 2 DNA Polymerase agitandola per una maggiore stabilità (**non agitare l'enzima con il vortex**).

Preparare la miscela master della PCR secondo la Tabella 4 in una provetta da microcentrifuga di dimensioni adeguate al numero totale di campioni da analizzare, in un'area pulita dedicata. Includere almeno un PC e un NTC nel calcolo.

NOTA



Come regola generale, se si analizzano meno di 10 campioni, utilizzare una quantità di miscela master sufficiente per un campione in più. Se si analizzano 10 o più campioni, utilizzare un volume di miscela master del reagente in eccesso pari a +10 %.

Tabella 4 Preparazione della reazione della miscela master della PCR

Componente	Volume		
	N. 1	N. 5	N. 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
Modello o campione di controllo del cDNA*	1,0 µL	5 x 1,0 µL	10 x 1,0 µL
Volume totale	25,0 µL	125,0 µL	250,0 µL

*L'ingresso del modello può essere aumentato a 2 µL; per questo è necessario regolare il volume dell'acqua priva di nucleasi.

Miscelare la miscela master agitando delicatamente con il vortex, quindi centrifugare brevemente.

Aliquotare 24,0 µL di miscela master della PCR nelle provette per PCR da 200 µL preparate e centrifugare brevemente le provette chiuse.

Applicazione di modelli e controlli cDNA

Aggiungere 1,0 µL dei seguenti tipi di campione alle provette per PCR preparate contenenti la miscela master per PCR.

NTC: aggiungere 1,0 µL di Nuclease-Free Water anziché un campione.

Modello cDNA: aggiungere 1,0 µL di campioni cDNA non diluiti.

PC: aggiungere 1,0 µL del Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control appena preparato, diluito 1:5 al posto del campione.

NOTA



Preparare prima NTC per evitare contaminazioni del controllo. Preparare il campione PC per ultimo per evitare contaminazioni incrociate dei campioni.

NOTA

Utilizzare almeno un controllo positivo PC e un controllo no template NTC per ogni esecuzione. In caso contrario, l'esecuzione non può essere convalidata.

Chiudere tutte le provette per PCR, agitare delicatamente e centrifugare.

Amplificazione della PCR

Programmare il termociclatore per PCR con il seguente profilo di amplificazione, assicurandosi di impostare il ramping a 4°C/secondi. Eseguire una PCR "hot start" per attivare la polimerasi e prevenire la formazione di prodotti di amplificazione aspecifici.

NOTA

L'utilizzo di termociclatori per PCR calibrati e ben mantenuti è essenziale, poiché le deviazioni possono influire negativamente sull'amplificazione di target sensibili, come KMT2A::MLLT4.

Tabella 5 PCR Protocollo

Temperatura	Tempo	
96°C	4 min	(avvio a caldo per l'attivazione della polimerasi)
96°C	30 sec	
60°C	120 sec	25 cicli
72°C	75 sec	
68°C	10 min*	
10°C	∞	in attesa

* Se si osserva una quantità maggiore di picchi di adenina in meno (-1 bp), è possibile un'estensione fino a 60 minuti.

NOTA



Se vengono utilizzati termociclatori con velocità di riscaldamento e raffreddamento regolabili, il **ramping deve essere regolato a 4 °C/secondo** per fornire un bilanciamento ottimale del kit.

NOTA



Per informazioni di base sull'impostazione, sulla programmazione e sulla manutenzione dei diversi strumenti per la PCR, consultare il manuale d'uso del rispettivo strumento.

Elettroforesi su gel capillare

Preparazione dei prodotti PCR

Dopo il completamento della PCR, rimuovere i campioni dal termociclatore e centrifugare brevemente.

NOTA



Dopo il completamento della PCR, i prodotti PCR possono essere conservati per 4 settimane a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C o a lungo termine a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C, al riparo dalla luce.

Scongelare, mescolare e centrifugare i reagenti:

- Hi-Di™ Formamide (non inclusa nel kit)
- Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder (tappo verde)
- DNA Size Standard BTO (550) (tappo arancione)

Preparare la miscela di denaturazione descritta nella [Tabella 6](#) e aggiungere una o due reazioni per compensare le variazioni di pipettaggio. Includere una reazione aggiuntiva per il ladder allelico.

Tabella 6 Miscela di denaturazione

Componente	Volume per reazione
Hi-Di™ Formamide	12,0 µL
DNA Size Standard BTO (550)	0,5 µL

Pipettare 12,0 µL di miscela di denaturazione nei pozzetti di una piastra per PCR (adatta all'uso con il Genetic Analyzer).

Aggiungere 1,0 µL di prodotto PCR o 1,0 µL Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder nei pozzetti. Sigillare la piastra per PCR con un foglio di alluminio adatto, agitare con il vortex e centrifugare brevemente.

NOTA

Il ladder allelico viene utilizzato per determinare correttamente i frammenti analizzati durante l'analisi dei dati. In ogni esecuzione di analisi della lunghezza dei frammenti, il ladder allelico deve essere analizzato almeno una volta per garantire un'analisi dei dati corretta.

NOTA

I capillari del dispositivo per elettroforesi su gel non devono mai esaurirsi. Se i campioni non occupano tutti i capillari, riempire i pozzetti aggiuntivi della piastra con 12,0 µL di Hi-Di™ Formamide in base al numero di capillari.

Denaturare i prodotti della PCR preparati su un termociclatore per PCR per 3 minuti a 95 °C, quindi raffreddare i campioni a 4 °C nel termociclatore. Centrifugare brevemente i campioni prima di eseguire l'analisi della lunghezza dei frammenti.

Analisi della lunghezza del frammento

Prima di svolgere la prima analisi della lunghezza del frammento, eseguire **Matrix Standard BT5 multi** (BIOTYPE GmbH) per eseguire un allineamento spettrale dei coloranti fluorescenti utilizzati per il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit (6-FAM™, BTG, BTY, BTO).

NOTA



Consultare le istruzioni per l'uso di Matrix Standard BT5 multi per l'installazione. Le istruzioni per l'uso sono disponibili su www.biotype.de/en/ifus o su richiesta scrivendo all'indirizzo e-mail support@biotype.de di BIOTYPE GmbH.

Dopo aver eseguito correttamente Matrix Standard BT5 multi, importare le impostazioni dello strumento fornito per 3500 Genetic Analyzer, come descritto nella Tabella 7 (www.biotype.de/en/template-files).

Tabella 7 File forniti per gli 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

Le specifiche per il protocollo strumentale richiesto sono descritte nella Tabella 8. Solo i parametri descritti devono essere regolati, mentre gli altri devono mantenere le impostazioni predefinite. Seguire le istruzioni per l'uso del produttore per impostare i parametri di esecuzione specifici.

Tabella 8 Parametri per i moduli di esecuzione dei diversi dispositivi di elettroforesi su gel capillare

	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

Diversamente dai valori indicati nella Tabella 8, il tempo di esecuzione può essere regolato per garantire che tutti i frammenti (60-550 bp) di DNA Size Standard 550 (BTO) vengano analizzati.

Per impostare un Size Standard protocol è necessario assegnare le seguenti dimensioni di DNA Size Standard 550 (BTO) al riquadro arancione:

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.

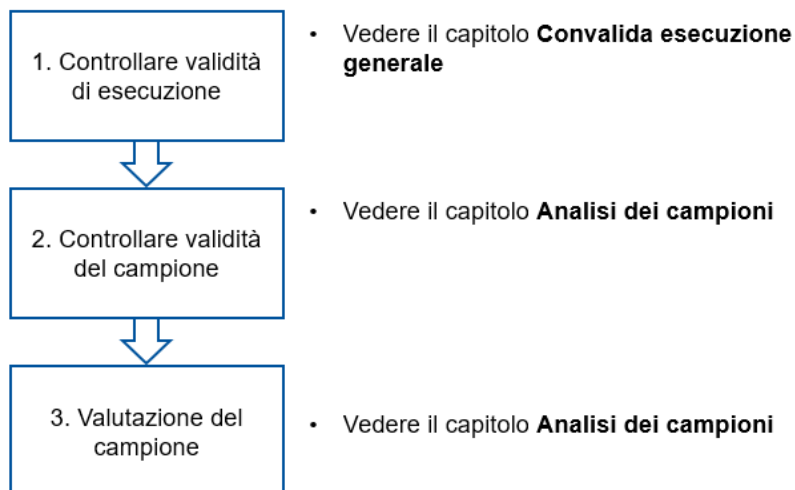
NOTA



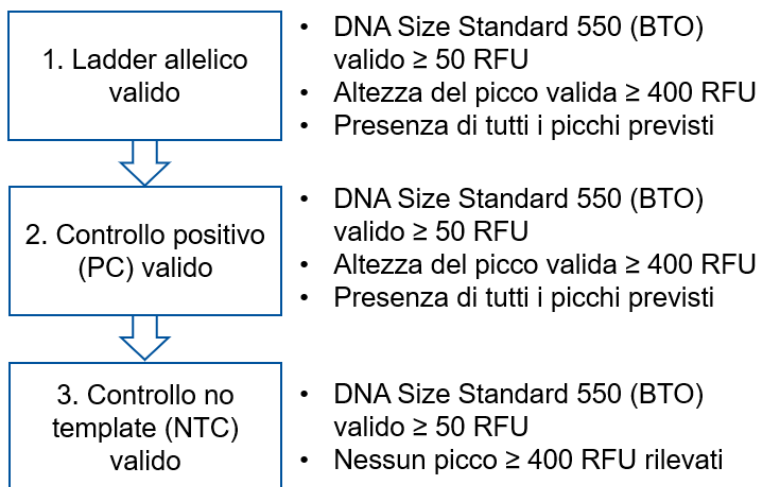
BIOTYPE GmbH fornisce modelli specifici per configurare in modo facile le impostazioni di esecuzione specifiche per l'analisi della lunghezza del frammento, nonché modelli di analisi per configurare facilmente il software di GeneMapper™ ID-X. Questi modelli possono essere scaricati su: www.biotype.de/en/template-files.

Analisi dei dati

Procedura generale per l'analisi dei dati



Validità di esecuzione generale



NOTA

L'intero intervallo di misurazione da 50 bp a 560 bp deve essere analizzato per valutarne la validità.

DNA Size Standard 550 (BTO)

La determinazione delle lunghezze esatte dei prodotti amplificati dipende dal tipo di dispositivo, dalle condizioni di elettroforesi e dallo standard dimensionale del DNA utilizzato. Data la complessità di alcuni target, la determinazione dimensionale dovrebbe basarsi su riferimenti distribuiti uniformemente.

Verificare DNA Size Standard 550 (BTO) in tutti i campioni per i seguenti criteri:

- Presenza di tutti i frammenti in: **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** (vedere [Figura 1](#))
- Tutti i frammenti sono presenti con ≥ 50 RFU
- Coefficiente di determinazione $R^2 > 0,995$
(vedere Size Match Editor di GeneMapper™ ID-X)
- L'altezza dei picchi dei frammenti non diminuisce in modo continuo con l'aumentare della lunghezza dei frammenti.

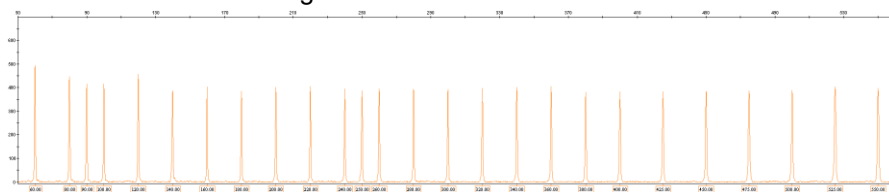


Figura 1 Elettroferogramma dei frammenti DNA Size Standard 550 (BTO), con lunghezze in bp

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder

Dopo aver verificato uno standard di dimensione valido, verificare che tutti i picchi nel ladder allelico siano presenti con ≥ 400 RFU.

NOTA

Il Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder include un picco per ciascun target rilevabile. Si prega di confrontare gli alleli con l'appendice [Figura 2](#).

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

Dopo aver verificato uno standard di dimensione valido, verificare che tutti i picchi PC specifici siano presenti con **≥ 400 RFU**.

Il Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control, che fa parte del kit di analisi, rappresenta i seguenti target (vedere [Tabella 9](#)).

Tabella 9 Picchi di controllo nel Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control

Panel	Picco di controllo
Blu	▪ QS-Control ▪ BCR::ABL_b2a3 ▪ RUNX1::RUNX1T1 ▪ ABL-Control
Verde	▪ KMT2A-PTD_e11e3
Giallo	▪ PML::RARA_bcr3

NOTA

Il Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control include almeno un picco per ciascun riquadro rilevabile. Si prega di confrontare gli alleli con l'appendice [Figura 3](#).

No template control NTC

Dopo aver verificato uno standard di dimensione valido, verificare che non ci siano picchi **≥ 400 RFU** nel NTC (vedere anche appendice [Figura 4](#)).

NOTA**i**

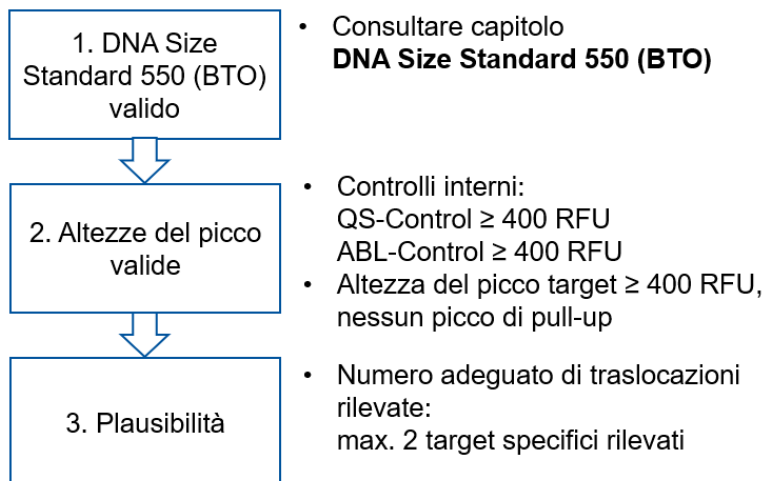
Utilizzando GeneMapper ID-X insieme ai file modello forniti per il metodo di analisi, i picchi < 400 RFU nei campioni del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit non vengono automaticamente assegnati con il nome dell'allele, consentendo di valutare facilmente il NTC.

NOTA**i**

Artefatti come piccoli dye blob possono essere presenti in modo più evidente all'interno del NTC. A causa dell'ampia base del picco, della forma anomala del picco e dell'assenza di assegnazione del picco, è possibile una differenziazione dai picchi degli ampliconi.

Analisi del campione

Analisi dei dati del flusso di lavoro



NOTA



Se i rilevamenti di più target superano il cut-off o se si riscontrano incertezze, controllare la sezione dedicata alla risoluzione dei problemi (ad esempio per un elenco di combinazioni di segnali note) o contattare l'assistenza clienti all'indirizzo e-mail support@biotype.de.

Utilizzando il GeneMapper™ ID-X software e i modelli specifici forniti da BIOTYPE GmbH, la convalida di base viene eseguita automaticamente.

Dopo aver verificato la validità dell'esecuzione e del campione, i dati del campione devono essere valutati.

NOTA



Mentype® AMLplex^{QS} è un **test esclusivamente qualitativo**. Questa applicazione non è adatta a quantificare i numeri di copie né a monitorare la malattia minima residua (MMR)

Quando si utilizzano i modelli di valutazione di BIOTYPE GmbH e si valuta con successo il ladder allelico dell'esecuzione, i frammenti PCR rilevati vengono denominati automaticamente. Una panoramica delle lunghezze dei frammenti dei prodotti PCR è riportata nella Tabella 10 seguente.

Tabella 10 Panoramica sulle lunghezze dei frammenti delle traslocazioni nel Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder del polimero POP-

4™. ‡ Due ampliconi per la variante KMT2A::MLLT3_6A; * Sebbene questa variante sia rilevabile con il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit, la lunghezza variabile dell'amplicone (circa 173 bp) impedisce l'assegnazione automatizzata

Panel/traslocazione	Lunghezz a [bp]	Riquadro/traslocazio ne	Lunghezz a [bp]
FAM Panel (canale blu)		BTG Panel (canale verde)	
CBFB::MYH11_TypeG	63	DEK::NUP214	78
CBFB::MYH11_TypeI	66	KMT2A-PTD_e9e3	87

Panel/traslocazione	Lunghezza [bp]	Riquadro/traslocazione	Lunghezza [bp]
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 (canale giallo)	
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		

Analisi dei dati con GeneMapper™ ID-X

Preparazione del GeneMapper™ ID-X software

Per istruzioni generali sull'applicazione e sull'analisi dei campioni eseguita con questo software, consultare il manuale d'uso del GeneMapper™ ID-X Software.

L'assegnazione degli alleli deve essere effettuata con il software di analisi GeneMapper™ ID-X in combinazione con i file modello del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit di BIOTYPE GmbH. I file modello BIOTYPE (vedere [Tabella 11](#)) possono essere scaricati sulla nostra pagina iniziale (www.biotype.de/en/template-files) o richiesti via e-mail all'indirizzo support@biotype.de. Il flusso di lavoro dell'analisi eseguito utilizzando il GeneMapper™ ID-X software è mostrato nella [Tabella 12](#).

Tabella 11 Modelli BIOTYPE GmbH per il GeneMapper™ ID-X Software, modelli specifici per ¹POP-1™, ²POP-4™ and ³POP-7™ polymer

Modello	Nome modello	
Panels*	AMLplexIVD_Panel1_v1x ¹ AMLplexIVD_Panel4_v1x ² AMLplexIVD_Panel7_v1x ³	o versioni superiori
BinSets*	AMLplexIVD_Bins1_v1x ¹ AMLplexIVD_Bins4_v1x ² AMLplexIVD_Bins7_v1x ³	o versioni superiori
Size Standard*	BTO_60-550_v1x	o versioni superiori
Analysis Method*	AMLplexIVD_Analysis1_v1x ¹ AMLplexIVD_Analysis4_v1x ² AMLplexIVD_Analysis7_v1x ³	o versioni superiori
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 Alleles	
	Table for 10 Alleles	

*Questi modelli devono essere sempre utilizzati per l'analisi dei dati. Gli altri file modello sono opzionali.

NOTA

i

L'importazione e la chiamata di alleli con i file di modello forniti è garantita solo se viene utilizzato il GeneMapper™ ID-X software. Durante l'utilizzo del GeneMapper™ software, potrebbero verificarsi problemi di importazione con alcuni file modello. Potrebbe essere necessario regolare Panels e Bins con una o più corse del ladder allelico sulla specifica configurazione strumentale. Per assistenza, scrivere a (support@biotype.de).

Tabella 12 Flusso di lavoro per l'analisi dei dati con GeneMapper™ ID-X

N.	Icona	Fase di lavoro								
1		Preparazione del software								
		Panel Manager Importare i file modello forniti per Panels e Bins								
		GeneMapper™ ID-X Manager Importare i file modello forniti per Analysis Method e Size Standard								
2		Importazione campione								
		Add Samples to Project - cercare la cartella di esecuzione, selezionare e Add to List → Add								
3		Analisi del campione								
		Selezionare le seguenti proprietà nelle colonne del foglio di esempio appropriate e scegliere Analyze .								
		<table><tr><th>Nome colonna</th><th>Selezione</th></tr><tr><td>Sample Type</td><td>Ladder allelico, controllo positivo, controllo negativo o campione</td></tr><tr><td>Analysis Method</td><td>Selezionare il modello precedentemente BIOTYPE importato AMLplexIVD_Analysis_v1x</td></tr><tr><td>Panel</td><td>Selezionare il modello precedentemente BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x</td></tr></table>	Nome colonna	Selezione	Sample Type	Ladder allelico, controllo positivo, controllo negativo o campione	Analysis Method	Selezionare il modello precedentemente BIOTYPE importato AMLplexIVD_Analysis_v1x	Panel	Selezionare il modello precedentemente BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x
Nome colonna	Selezione									
Sample Type	Ladder allelico, controllo positivo, controllo negativo o campione									
Analysis Method	Selezionare il modello precedentemente BIOTYPE importato AMLplexIVD_Analysis_v1x									
Panel	Selezionare il modello precedentemente BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x									

N.	Icona	Fase di lavoro
		Size Standard Selezionare il modello precedentemente BIOTYPE template BTO_60-550_v1x
4	Verifica dei controlli	
	 	Controllare la validità dei controlli (ladder allelico, controllo positivo, controllo negativo). Se le altezze di picco sono sufficienti, l'assegnazione viene eseguita secondo le specifiche del Analysis Method
5	Valutazione del campione	
	 	Controllare la validità del campione. Se le altezze di picco sono sufficienti, l'assegnazione viene eseguita secondo le specifiche del Analysis Method

NOTA**i**

Utilizzando i file modello forniti per i Analysis Method, Bins, Panels e selezionando il tipo di campione corrispondente, la validità di questi campioni viene controllata automaticamente dal software. I flag di controllo qualità SOS (Sample off-Scale), SQ (Sizing Quality), OMR (Outside Marker Range) devono essere verdi per superare il controllo validità.

ARNM	SOS	SQ	SSPK	MIX	OMR	CGQ
						

NOTA**i**

Utilizzare Size Match Editor in GeneMapper™ ID-X per valutare lo standard dimensionale. Se la chiamata automatica dei frammenti non dà risultato positivo, le triplette 80/90/100 bp e 240/250/260 bp possono essere utilizzate come orientamento nell'assegnazione manuale dei picchi.

Risoluzione dei problemi

Per un rilevamento accurato e affidabile del target, l'analisi post-PCR, compresa l'assegnazione e la convalida automatica del target, deve essere eseguita utilizzando il GeneMapper ID-X software convalidato insieme ai file modello di BIOTYPE. In caso di dubbi, contattare support@biotype.de.

Picchi di pull-up

I picchi di pull-up possono verificarsi se le altezze non rientrano nell'intervallo di rilevamento lineare o se è stata applicata una matrice non corretta. Appaiono in corrispondenza di picchi specifici in altri canali colorati, in genere con intensità di segnale inferiori. Questo effetto deve essere tenuto in considerazione nei casi di alti profili di amplificazione dei seguenti target:

- PML::RARA_bcr3 (canale giallo) provoca un picco di pull-up inKMT2A::ELL_e10e2 (canale verde)
- RUNX1::RUNX1T1 (canale blu) provoca un picco di pull-up inKMT2A::MLLT4 (canale verde, solo se è stato utilizzato il POP-7TM Polymer)

Aggiunta di nucleotidi indipendente dal modello

A causa della sua attività transferasica terminale, la Multi Taq 2 DNA Polymerase tende ad aggiungere un radicale adenosina all'estremità 3' dei frammenti di DNA amplificati. Il picco artefatto è più corto di una base rispetto al previsto (picchi di -1 bp). Tutti i primer BIOTYPE sono progettati per ridurre al minimo questi artefatti. La formazione di artefatti è ulteriormente ridotta dall'eventuale prolungamento della fase di estensione finale del protocollo PCR a 68 °C per 60 minuti. L'altezza del picco dell'artefatto è correlata alla quantità di cDNA. I laboratori devono definire i propri limiti individuali per l'analisi dei picchi.

Artefatti

La temperatura ambiente può influenzare le prestazioni dei prodotti PCR sugli strumenti multicapillari; si possono verificare picchi sdoppiati. Inoltre, in alcuni casi, l'assegnazione automatica potrebbe essere influenzata. Se si verificano questi effetti, si raccomanda di iniettare nuovamente il campione a una temperatura ambiente più elevata. Si consiglia sempre di utilizzare materiali di consumo nuovi secondo le raccomandazioni del produttore.

Influenza dei polimeri

Il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit è stato convalidato e certificato per l'analisi sul POP-4™ polymer. L'uso di altri polimeri (come POP-7™ o POP-1™) è stato verificato, ma potrebbe influenzare il comportamento di esecuzione di prodotti PCR specifici. Inoltre, il rumore di fondo potrebbe aumentare a causa del diverso comportamento dei coloranti fluorescenti liberi.

Deviazioni nel pipettaggio

L'analisi di robustezza del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit ha dimostrato che il kit è robusto rispetto a deviazioni medie dal protocollo descritto (+/- 10%). Una deviazione media (+/-20 %) dal protocollo sperimentale descritto potrebbe essere più critica ai fini dell'analisi. È essenziale prestare attenzione a deviazioni medie del -20 % nelle componenti della PCR, poiché riducono significativamente l'altezza del segnale. I target più sensibili in questo contesto sono KMT2A::MLLT4 e DEK::NUP214.

Per ridurre al minimo le deviazioni, si raccomanda di utilizzare pipette calibrate, di effettuare un pipettaggio preciso e di mescolare accuratamente.

Picchi di controllo ABL bassi

Il controllo ABL interno forma l'amplicone più lungo del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit ed è quindi un marcatore essenziale per il controllo di qualità. In caso di bassa altezza del picco ABL-control, la causa più probabile è tra le seguenti:

Input di modello troppo basso nella reazione: determinare la concentrazione di RNA e aumentare l'input di sintesi del cDNA, secondo necessità.

RNA frammentato, cioè ampliconi più piccoli provenienti dai target, possono essere positivi, ma il controllo interno ABL è assente. Verificare che il flusso di preparazione del campione non sia contaminato da RNase. È noto che la frammentazione di RNA si verifica nei materiali dei campioni archiviati.

Sintesi cDNA inefficace: garantire il rispetto delle istruzioni del produttore durante la sintesi di cDNA. Utilizzare uno dei kit di sintesi di cDNA convalidati, come descritto nel capitolo Trascrizione nel cDNA.

Il campione è compromesso dalla presenza dell'enzima della trascrittasi inversa attiva: assicurarsi di seguire le istruzioni del produttore, in particolare per quanto riguarda la fase di inattivazione termica durante la sintesi di cDNA.

Ampliconi aggiuntivi o doppi positivi

Si prevede che la maggior parte dei campioni dei pazienti mostri un risultato negativo o positivo per una traslocazione. La presenza di più traslocazioni è un risultato insolito e potrebbe richiedere ulteriori verifiche. Tuttavia, alcune combinazioni sono state osservate in precedenza nei campioni dei pazienti, come ad esempio:

Il target BCR::ABL_b2a3 potrebbe apparire con un'altezza di picco relativamente bassa in caso di forte amplificazione per il ABL-control o qualsiasi altra variante di trascrizione di BCR::ABL (circa il 5-10 % del risultato del target principale).

È noto che KMT2A partial tandem domain (KMT2A-PTD) si verifica simultaneamente ad altre traslocazioni e in riarrangiamenti complessi che possono apparire positivi per più di una variante KMT2A-PTD.

Durante l'utilizzo del POP7TM-Polymer, la traslocazione CBFB::MYH11_Type A potrebbe portare a un segnale non specifico per RUNX1::RUNX1T1 e CBFB::MYH11_Type F. Il picco RUNX1::RUNX1T1 viene assegnato come fuori scala quando si utilizza il polimero POP4 e può essere verificato utilizzando la linea cellulare ME-1. Entrambi i picchi laterali aspecifici mostrano un'altezza di picco RFU inferiore rispetto a CBFB::MYH11_Type A. Quando si utilizza POP7TM-Polymer, un picco fuori scala non specifico può essere assegnato come traslocazione CBFB::MYH11_Type I con altezze di picco inferiori a 2000 RFU.

Il target KMT2A::MLLT4 si presenta con due diverse lunghezze di ampliconi, a seconda della prevalenza specifica del campione delle varianti di trascrizione. La maggior parte dei campioni dei pazienti mostra entrambi gli ampliconi con una differenza di lunghezza di tre nucleotidi come doppio picco nel bin KMT2A::MLLT4 target. Si tratta di un risultato valido e non sono necessarie misure correttive.

Traslocazioni KMT2A possono verificarsi con il punto di rottura nell'esone 9 (più comune) o negli esoni 10 e 11 (raro). I picchi fuori scala marcati nel

canale verde possono derivare da una traslocazione KMT2A atipica e possono essere verificati con altri metodi.

La variante di trascrizione KMT2A::MLLT3 target 6A può produrre due ampliconi rilevabili in caso di input molto elevato e qualità dell'RNA molto alta; i picchi corrispondenti sono 6A_S (short, obbligatorio) e 6A_L (long, opzionale). Si tratta di un fenomeno necessario e insito nella progettazione del primer del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit. Si tratta di un risultato valido e non sono necessarie misure correttive.

Un picco fuori scala nel canale giallo tra i bins di PML::RARA bcr1 e bcr3 è molto probabilmente causato da una variante PML::RARA bcr2. Questo target presenta diversi punti di interruzione nell'esone 6 PML e pertanto non può essere assegnato ad alcun bin specifico.

Valutazione delle prestazioni

Sensibilità analitica

Il tipo di campione del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit è definito come cDNA trascritto da RNA cellulare isolato da sangue intero venoso periferico o aspirato di midollo osseo. Per i campioni di sangue, l'RNA nell'intervallo da 50 ng a 1000 ng è misurabile con un'altezza di picco sufficiente dell'ABL-Control, utilizzando il cDNA synthesis kits SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) e il High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) durante questa valutazione delle prestazioni. Presupponendo un'efficienza di trascrizione del 100%, si ottiene un intervallo di concentrazione di cDNA compreso tra 2,5 ng/μL e 50 ng/μL; nella reazione PCR si utilizza 1 μL di cDNA. Per i campioni di midollo osseo, l'RNA nell'intervallo da 50 ng a 1000 ng, utilizzando il SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific), e da 100 ng a 1000 ng, utilizzando il High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), è misurabile con un'altezza di picco sufficiente dell'ABL-Control. Assumendo un'efficienza di trascrizione del 100%, si ottiene un intervallo di concentrazione di cDNA di 2,5 ng/μL, rispettivamente 5 ng/μL - 50 ng/μL; nella reazione PCR si utilizza 1 μL di cDNA. L'input RNA ottimale è definito come 1000 ng per un campione di sangue intero periferico e 500 ng per un campione di midollo osseo. In

caso di campioni con scarsa concentrazione di RNA o target critici, l'input di cDNA nella PCR può essere aumentato fino a 4 µL per il cDNA trascritto con il High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), indipendentemente dal tipo di campione. Per il cDNA trascritto con il SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific), l'input del cDNA è limitato a un massimo di 2 µL.

Il Limit of Blank (LoB) è stato testato su 12 campioni di diversa origine alla quantità ottimale di input precedentemente definita. Poiché in nessuno dei 12 campioni analizzati sono stati rilevati picchi aspecifici al di sopra della soglia di 400 RFU di altezza di picco nell'intervallo da 55 bp a 550 bp, è possibile impostare una soglia di 400 RFU.

Il Limit of Detection (LoD) del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit è stato testato con 6 campioni artificiali con background cDNA, coprendo tutte le coppie di primer nella miscela di primer con coppie di primer che hanno rilevato più di un target, amplificando la variante di trascrizione target più lunga e quindi più difficile da rilevare.

Il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit ha mostrato un limite di rilevazione accettabile secondo i criteri di accettazione con un LoD massimo di 400 copie per i target testati (vedere [Tabella 13](#)), ad eccezione di KMT2A::MLLT4, che ha comunque mostrato un risultato accettabile con un LoD di 1000 copie. Poiché non è stato possibile testare tutte le varianti di trascrizione delle fusioni geniche rilevabili, si ritiene che un LoD complessivo di 1000 copie, che è stato il risultato più alto tra i target testati, possa essere applicato in modo sicuro.

Tabella 13. LoD per il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit.

Campione	Target	LoD [copie]
Campione 1	CBFB::MYH11_TypeJ	200
	BCR::ABL_e1a2	200
	CBFB::MYH11_TypeB	200
	KMT2A-PTD_e11e3	200
	PML::RARA_bcr1	400
Campione 2	CBFB::MYH11_TypeC	200
	CBFB::MYH11_TypeA	100

Campione	Target	LoD [copie]
	NPM1::MLF1	200
	KMT2A::MLLT3_6A_S	100
	KMT2A::MLLT3_6A_L	200
	PML::RARA_bcr3	200
Campione 3	CBFB::MYH11_TypeG	200
	BCR::ABL_b2a3	100
	CBFB::MYH11_TypeE	200
	KMT2A::ELL_e10e3	100
Campione 4	CBFB::MYH11_TypeI	200
	MLLT10_240::PICALM_2092	200
	RUNX1::RUNX1T1	400
	DEK::NUP214	200
Campione 5	KMT2A::MLLT4 (short)	1000
Campione 6	KMT2A::MLLT4 (short)	500
	KMT2A::MLLT4 (long)	500

Poiché il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit è un test qualitativo concepito per determinare la presenza o l'assenza dell'analita target, il test Limit of Quantitation (LoQ) non è considerato rilevante per l'uso previsto.

Specificità analitica

Abbiamo testato la chiamata automatica degli alleli con il ladder allelico e la concordanza dell'assegnazione degli alleli rispetto ai campioni artificiali dei target di traslocazione utilizzando il GeneMapper™ ID-X software. Sulla base dei risultati, vengono definite le impostazioni del dispositivo specifiche del test per la genotipizzazione mediante elettroforesi su gel capillare (bins e panels) dell'Genetic Analyzer.

I primer della PCR sono progettati per legarsi in modo complementare alla sequenza ufficiale del DNA di riferimento del genoma umano. Varianti genetiche come il Single Nucleotide Polymorphism (SNPs, INDELs o delezioni) possono influenzare il legame specifico del primer e sono state

valutate attraverso le voci del dbSNP relative al Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit. Una voce (rs73504425) comporta la perdita della funzione di primer. L'allele della variante è presente nello 0,6 % della popolazione africana e si trova all'interno del sito di legame del primer per PICALM::MLLT10, un gene di fusione raramente riportato con una prevalenza di <1 %.

Inoltre, è stata eseguita una ricerca BLAST sul trascrittoma umano per Mentype® AMLplex^{QS} Primer mix, che non ha prodotto prodotti di amplificazione aspecifici nell'intervallo 0 – 600 bp.

Accuratezza ed esattezza

L'accuratezza analitica del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit si basa sui relativi risultati degli studi di veridicità. BIOTYPE GmbH partecipa attivamente a un programma External Quality Assessment (EQA) dal 2013. La presenza o l'assenza di traslocazioni nei campioni è determinata dall'accordo tra i risultati di tutti i partecipanti alla EQA. In totale sono stati analizzati 68 campioni dal 2013.

Sulla base di questi risultati è stata creata una matrice di contingenza basata sul confronto tra i risultati (positivi/negativi) e i risultati effettivi (positivi/negativi) del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit, confermata dal consenso di tutti i partecipanti al External Quality Assessment program. Secondo il CLSI EP12 (terza edizione), le metriche di prestazione chiave mostrate nella Tabella 14 sono state calcolate sulla base della matrice di contingenza.

Tabella 14 Caratteristiche analitiche del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit.

Caratteristiche analitiche	Stima	Intervallo di confidenza inferiore del 95 %	Intervallo di confidenza superiore del 95 %
Sensibilità analitica	92,2 %	81,5 %	96,9 %
Specificità analitica	94,1 %	73,0 %	99,0 %
Valore predittivo positivo	97,9 %	89,1 %	99,6 %

Caratteristiche analitiche	Stima	Intervallo di confidenza inferiore del 95 %	Intervallo di confidenza superiore del 95 %
Valore predittivo negativo	80,0 %	58,4 %	91,9 %
Accuratezza	92,6 %	83,9 %	96,8 %

Questi calcoli forniscono una misura completa della capacità del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit di classificare correttamente i casi positivi e negativi rispettivamente con il 92 % e il 94 % di probabilità. La percentuale complessiva di risultati corretti è del 93 %, a dimostrazione di un'elevata affidabilità. Il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit mostra elevate prestazioni analitiche, convalidando l'efficacia e l'affidabilità del test.

Precisione

Abbiamo valutato la ripetibilità e la riproducibilità del test in base a ISO 5725-2:2022-05 e CLSI EP05 (terza edizione). Cinque campioni artificiali e il Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control sono stati valutati in uno studio multicentrico 5 x 5 x 3 (giorno x replica x sito). Lo studio multicentrico esamina la principale fonte di variazione (ripetibilità e riproducibilità) dovuta ai diversi siti testati, che presenteranno operatori diversi che misurano in siti diversi utilizzando strumenti diversi. La ripetibilità risultante variava tra l'8,3 % di CV e il 15,6 % di CV e la riproducibilità tra il 14,6 % di CV e il 30,5 % di CV. Nel complesso, il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit mostra una precisione accettabile con $SD_{Rep} \leq 2500$ RFU per tutte le fusioni geniche specifiche testate con i campioni artificiali da 1 a 5 e per il Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control.

Valore cut-off del test

Il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit utilizza il rilevamento qualitativo delle fusioni geniche tramite PCR endpoint. Pertanto, uno dei valori limite rilevanti per il test è l'altezza minima del picco per distinguere in modo sicuro tra rumore di fondo tecnico e rilevamento effettivo del target. Il cut-off dell'altezza del picco RFU è stato determinato a 400 RFU con i dati del test di sensibilità analitica.

Interferenti e reazioni incrociate

I potenziali interferenti che potrebbero influenzare i risultati della procedura di misurazione sono stati valutati in linea con le raccomandazioni delle linee guida CLSI EP07 (terza edizione) e EP37 (prima edizione). Per il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit, sono stati determinati gli interferenti endogeni ed esogeni, è stata testata la loro massima concentrazione (C_{max}) prevista nella reazione PCR, come suggerito nelle linee guida, e, nel caso in cui fosse stata osservata un'interferenza, sono state testate ulteriori concentrazioni per determinare la concentrazione alla quale non è rilevabile alcuna interferenza.

I risultati non hanno mostrato alcun effetto di interferenza del DNA interferente endogeno testato a 1 ng nella reazione PCR, quando la digestione DNA è stata effettuata come parte dell'elaborazione del campione.

Poiché per l'interferente endogeno del sangue è stato osservato un effetto di interferenza alla C_{max} calcolata dello 0,87 % v/v nella reazione PCR, sono state testate ulteriori diluizioni finché non è stata rilevata alcuna interferenza. Lo 0,087 % v/v di sangue non ha mostrato alcuna interferenza. Tuttavia, la contaminazione da sangue può essere rilevata visivamente nella reazione PCR o nella sospensione dell'RNA isolato tramite un cambiamento di colore arancione. Se si osserva un cambiamento di colore, si raccomanda di ripetere l'isolamento del RNA per evitare potenziali interferenze.

Per gli interferenti esogeni DTT, RNase Inhibitor, DNase, Ethanol, Metoclopramide, EDTA, Hydroxyurea e Citrate, non è stato osservato alcun effetto di interferenza ai rispettivi C_{max} , dove le deviazioni dal gruppo non trattato osservate per i campioni testati rientravano nei limiti accettati.

Per quanto riguarda gli interferenti esogeni, trascrittasi inversa, eparina e proteinasi K, l'interferenza è stata osservata alla rispettiva C_{max} calcolata o raccomandata dalla CLSI EP37 (prima edizione); ulteriori diluizioni sono state testate finché non è stata rilevata alcuna interferenza. Per l'enzima della trascrittasi inversa, la concentrazione di C_{max} testata allo 0,2 % v/v ha mostrato interferenze, a meno che l'enzima non fosse inattivato tramite calore, come indicato dai produttori dei kit di sintesi cDNA testati. Per l'eparina 3,3 U/dL e l'enzima proteinasi K 0,0001 % v/v non è stata riscontrata alcuna interferenza.

Gli anticoagulanti del sangue, EDTA, citrato di sodio ed eparina, sono stati testati in aggiunta con i kit di isolamento raccomandati. Non è stato rilevato alcun impatto sulle prestazioni analitiche. Prevediamo che il flusso di lavoro dei kit di isolamento elimini in modo efficace tutte le sostanze interferenti testate derivanti da anticoagulanti e reagenti di isolamento di RNA.

Tabella 15 Concentrazioni non interferenti di interferenti endogeni ed esogeni.

Tipo di interferente	Categoria	Interferente	Concentrazione testata non interferente
Endogeno	Componenti del sangue intero	Sangue intero	0,087 % v/v nella reazione PCR
Esogeno	Anticoagulanti	EDTA	0,099 mg/dL
		Citrato	0,004 % v/v nella reazione PCR
		Eparina	3,3 U/dL
	Reagenti per isolamento RNA	Proteinase K	0,0001 % v/v nella reazione PCR
		Etanolo	0,3 % v/v nella reazione PCR
		DNase	0,16 % v/v nella reazione PCR
	Reagenti per trascrizione inversa in cDNA	DTT	0,2 % v/v nella reazione PCR
		RNase Inhibitor	0,2 % v/v nella reazione PCR
		Trascrittasi inversa	0,2 % v/v nella reazione PCR (inattivato tramite calore)
	Agente antiemetico	Metoclopramide	0,225 mg/dL
	Agente antineoplastico	Hydroxyurea	3,08 mg/dL

Stabilità in uso

Tutti gli studi di stabilità sono stati pianificati in conformità a ISO 23640:2015 e alle linee guida CLSI EP25-(seconda edizione). Per tutti gli studi di stabilità è stata seguita la seguente procedura: Il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit è stato testato in più timepoint e per diverse durate. Sono stati analizzati campioni artificiali e il Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control. La valutazione finale delle varie condizioni comprendeva il confronto tra le medie del timepoint iniziale (T0) e dei timepoint successivi (Tn) ed è stata calcolata con la seguente equazione:

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

Per lo studio della stabilità in uso sono stati eseguiti due esperimenti. Uno per testare la stabilità dopo diversi cicli di congelamento e scongelamento e uno per testare la stabilità dei kit durante l'uso simulato dopo l'apertura. Questi esperimenti rientrano nello studio sulla stabilità del congelamento e dello scongelamento e della durata di conservazione dichiarata.

In base ai risultati, il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit è stabile fino a 20 cicli di congelamento e scongelamento e può essere utilizzato fino a 24 mesi dopo l'apertura.

Dati sulle prestazioni cliniche

Progettazione dello studio, aspetti etici e normativi

I metodi di riferimento del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit sono stati testati su 297 campioni di pazienti e 10 volontari sani. Lo scopo di questo studio era quello di fornire prove cliniche ai sensi dei §§ 20-24 della legge sui dispositivi medici "Medizinproduktegesetz". Utilizzando i metodi di riferimento citogenetici (FISH) e o monoplex-qPCR interni validati, è stato necessario dimostrare la concordanza con il dispositivo. La conferma della commissione etica competente è stata ricevuta il 06.06.2012.

Metodi di riferimento

L'obiettivo primario è la determinazione della sensibilità e della specificità diagnostica rispetto ai metodi di riferimento. Come metodo di riferimento, l'Fluorescence-In-Situ-Hybridization (FISH) standardizzata è stata eseguita

per una selezione di traslocazioni [Grimwade et al. Blood 116: 354-65, 2010]. Le traslocazioni non esaminate attraverso analisi citogenetica sono state analizzate con test monoplex-nested-PCR stabiliti e convalidati nel laboratorio di prova [Steudel et al. Genes Chromosomes Cancer 37: 237-51, 2003, van Dongen et al. Leukemia 13: 1901-28, 1999]

Estrazione e purificazione dell'RNA

Le cellule mononucleate (MNC) sono state raccolte dai campioni con centrifugazione a gradiente di densità. Successivamente, sono stati eseguiti l'isolamento totale dell'RNA e la trascrizione inversa in cDNA, utilizzando kit disponibili in commercio. La qualità del cDNA è stata analizzata attraverso test PCR in tempo reale. I test PCR singoli convalidati hanno confermato i geni di fusione e le mutazioni.

Risultati

Il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit non ha riscontrato risultati falsi positivi con il cDNA testato nei 10 volontari sani analizzati.

Dei 297 campioni di pazienti analizzati, 5 non hanno potuto essere esaminati a causa del rilevamento del controllo ABL interno al di sotto della soglia raccomandata. Dei restanti 292 campioni, 201 hanno mostrato risultati realmente negativi rispetto ai metodi di riferimento.

I risultati individuali dei test di confronto sono riassunti nella Tabella 16. Non è stato possibile valutare la sensibilità diagnostica delle fusioni geniche PICALM::MLLT10 (CALM-AF10) e KMT2A::MLLT4 (MLL-AF6), poiché non erano disponibili campioni pre-caratterizzati positivi.

Complessivamente, è stata raggiunta una sensibilità diagnostica del 94 % e una specificità diagnostica del 99,5 %.

Tabella 16 Conclusione dei risultati dei dati di performance clinica del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit. *I dati di prevalenza sono stati citati da Grimwade et al. 2010. n.e. = non valutato

Biomarcatore				Valutazione della performance clinica (n=292)					
Fusione del gene	Aberrazione cromosomica	Variante	Prec* [%]	Vero positivo	Vero negativo	Falso positivo	Falso negativo	Sensibilità diagnostica [%]	Specificità diagnostica [%]
RUNX1:: RUNX1T1	t(8;21) (q22;q22)	n. b.	7	16	275	0	1	94,1	100,0
BCR:: ABL	t(9;22) (q34;q11)	e1a3	1	1	291	0	0	100,0	100,0
		e1a2							
		b3a2							
		b3a3							
		b2a2							
		b2a3							
PICALM:: MLLT10	t(10;11) (p13;q14)	MLLT10_240- PICALM_1987 MLLT10_240- PICALM_2092	1	0	292	0	0	n.e.	100,0
CBFB:: MYH11	inv(16) (p13;q22)	Tipo A	5	28	262	0	2	93,3	100,0
		Tipo B							
		Tipo C							
		Tipo D							
		Tipo E							
		Tipo F							
		Tipo G							
		Tipo H							
		Tipo J							
DEK:: NUP214	t(6;9) (p23;q34)	n. b.	1	3	289	0	0	100,0	100,0
KMT2A:: MLLT4	t(6;11) (q27;q23)	n. b.	<0,5	0	292	0	0	n.e.	100,0
KMT2A:: MLLT3	t(9;11) (p22;q23)	6A (6A_S; 6A_L)	1	4	287	0	1	80,0	100,0
		7A							
		8A							
		6B							
KMT2A:: ELL	t(11;19) (q23;p13.1)	e10e2	1	0	290	1	1	0,0	99,7
		e10e3							
KMT2A-PTD	Parziale	e9e3	5-7	23	269	0	0	100,0	100,0
	In tandem	e10e3							
	Duplicazione	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							
Riepilogo			37	85	201	1	5	94,4	99,5

Valutazione diagnostica

Le caratteristiche di prestazione clinica del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit hanno mostrato risultati accettabili. I parametri per la valutazione delle prestazioni cliniche sono stati calcolati in base all'Allegato I, sezione 9.1b dell'IVDR (UE) 2017/746, come indicato nella Tabella 17.

Tabella 17 Caratteristiche diagnostiche del Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit

Caratteristiche diagnostiche	Stima	Intervallo di confidenza inferiore	Intervallo di confidenza superiore
Sensibilità diagnostica	94,4 %	87,7 %	97,6 %
Sensibilità diagnostica	99,5 %	97,3 %	99,9 %
Valore predittivo positivo	98,8 %	93,7 %	99,8 %
Valore predittivo negativo	97,6 %	94,4 %	99,0 %
Accuratezza diagnostica	98,0 %	95,6 %	99,1 %

Controllo della qualità

Tutti i componenti del kit sono sottoposti presso BIOTYPE GmbH a un rigoroso processo di garanzia della qualità. La qualità del kit di test è costantemente monitorata per garantire un'utilizzabilità senza restrizioni. Si prega di contattarci per qualsiasi domanda sulla garanzia di qualità.

Assistenza tecnica

Per informazioni tecniche, contattare il nostro team di assistenza clienti:

Indirizzo e-mail: support@biotype.de

telefono: +49 (0)351 8838 400

Riferimenti

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.

Limitazioni d'uso

- Le procedure indicate nel presente manuale devono essere seguite come descritto. Eventuali inosservanze possono causare il fallimento del test o dare risultati errati.
- L'uso di questo prodotto è limitato agli utenti professionisti di laboratorio appositamente istruiti e formati sulle tecniche di PCR e di elettroforesi capillare su gel.
- Per l'esecuzione ottimale di questo test sono necessarie procedure appropriate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni.

- Questo test non deve essere utilizzato direttamente sul campione. Prima di utilizzare questo test è necessario eseguire metodi di estrazione degli acidi nucleici appropriati.
- Il kit è stato convalidato solo per l'uso con i reagenti, gli strumenti e il software descritti nel capitolo Materiali e dispositivi necessari, ma non forniti.
- Mentype® AMLplex^{QS} è stato progettato, convalidato e certificato come strumento di screening per la classificazione dei sottotipi di LMA. Questa applicazione non è adatta a quantificare i numeri di copie, come il monitoraggio di Minimal Residual Disease (MRD), né a convalidare altri sottotipi di leucemie o di LMA pediatrica.
- A causa della variabilità genetica, il single nucleotide polymorphism (SNPs o il insertion deletion polymorphism (INDELs possono influenzare l'efficacia del primer o l'accessibilità del modello. Un'analisi della versione più recente dell'assemblaggio del genoma umano (HG38) per tutti i gruppi etnici ha trovato un solo SNP critico che comporta la perdita della funzione del primer. L'allele della variante è presente nello 0,6 % della popolazione africana e si trova all'interno del sito di legame del primer per PICALM::MLLT10, un gene di fusione raramente riportato con una prevalenza di <1 %. Tuttavia, a causa della bassa prevalenza di fusioni geniche e della bassa probabilità di frequenza di SNP nella popolazione mondiale, il rischio di risultati falsi-negativi è basso. In caso di incertezze, si consiglia di confermare i risultati utilizzando i metodi di riferimento.
- Per garantire le prestazioni del kit è necessaria una buona pratica di laboratorio.
- I risultati devono essere interpretati da operatori sanitari qualificati.
- L'interpretazione dei risultati deve tenere conto della possibilità di falsi negativi e falsi positivi.
- Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo non corretto.

Informazioni sugli ordini

Inviare gli ordini via e-mail all'indirizzo: sales@biotype.de.

Prodotto	Dimensioni dell'imballaggio	Numero d'ordine
Mentype® AMLplex ^{QS} PCR Amplification Kit	25 reazioni	45-12100-0025
	100 reazioni	45-12100-0100
	400 reazioni	45-12100-0400
Matrix Standard BT5 multi	1 x 25 µL	45-15100-0025
	2 x 25 µL	45-15100-0050

Marchi e dichiarazioni di non responsabilità

Mentype® è un marchio registrato di BIOTYPE GmbH.

Altri marchi registrati: ABI PRISM®, GeneMapper®, SuperScript™, GeneAmp® e Applied Biosystems® (Applied Biosystems LLC group); QIAamp® (Qiagen); POP-4™, POP-1™, POP-7™ (Europe: Applied Biosystems LLC, US: Life Technologies Corporation). PCR sono protetti da brevetti. I titolari dei brevetti sono Hoffmann-La Roche Inc. e F. Hoffmann-La Roche (Roche).

I nomi registrati, i marchi di fabbrica, ecc. utilizzati nel presente documento, anche se non espressamente contrassegnati come tali, non sono da considerarsi non protetti dalla legge.

Il Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit è un kit diagnostico a marchio CE secondo il Regolamento europeo sulla diagnostica in vitro (UE) 2017/746.

Il prodotto non dispone di licenza di Health Canada e non è autorizzato o approvato dalla FDA.

Non disponibile in tutti i Paesi.

© 2025 BIOTYPE GmbH; tutti i diritti riservati.

Spiegazione dei simboli



Produttore



Codice lotto



Contiene una quantità di reagenti sufficiente per <N> test



Consultare le istruzioni per l'uso elettroniche (eIFU)



Data di scadenza



Limite di temperatura



Numero di catalogo



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Tenere lontano dalla luce del sole



Mantenere asciutto



Unique device identifier

Ulteriori marcature utilizzate in queste istruzioni per l'uso:



Suggerimenti utili

Attenzione, seguire scrupolosamente le istruzioni!

testo sottolineato in blu

Link che portano a contenuti esterni come homepage, indirizzi e-mail

testo sottolineato in nero

Link incrociati nel documento per facilitare la navigazione

testo rientrato, corsivo, grassetto

Campi che devono essere cliccati nel software

Appendice

Elenco geni target

Gene	Nomi alternativi	ID trascrizione
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

Elettroferogrammi di campioni di riferimento

Nelle pagine seguenti sono riportati esempi di elettroferogrammi del Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder ([Figura 2](#)), del Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control (PC, [Figura 3](#)) e di un controllo no template (NTC, [Figura 4](#)).

Tutti i campioni sono stati amplificati su un termociclatore PCR ProFlex e analizzati su un 3500 Genetic Analyzer (POP-4, array da 36 cm), utilizzando il parametro di esecuzione convalidato. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando la versione 1.6 di GeneMapper ID-X. Sono stati applicati Bins, Panels e Analysis method secondo la [Tabella 11](#).

Gli elettroferogrammi vengono ingranditi fino a una lunghezza del frammento di 50–560 bp (asse x). Il ridimensionamento dell'asse y è stato eseguito individualmente:

[Figura 2](#), pagina [57](#): Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder: 3.000 RFU

[Figura 3](#), pagina [58](#): Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control: 9.000 RFU

[Figura 4](#), pagina [59](#): Controllo no template (NTC): 9.000 RFU

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder

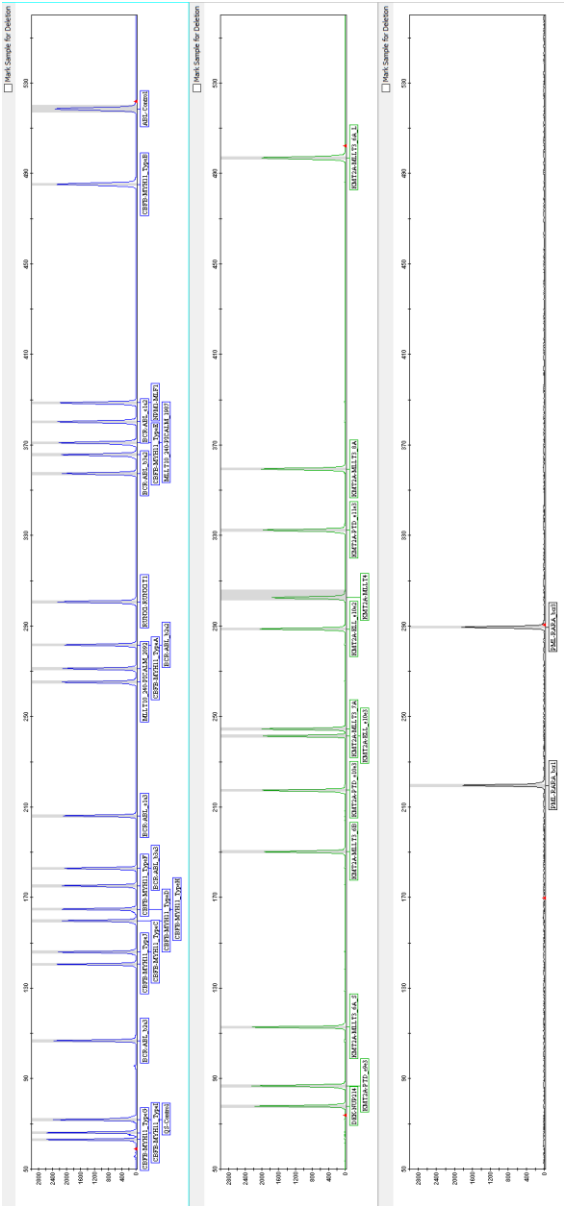


Figura 2 Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder

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

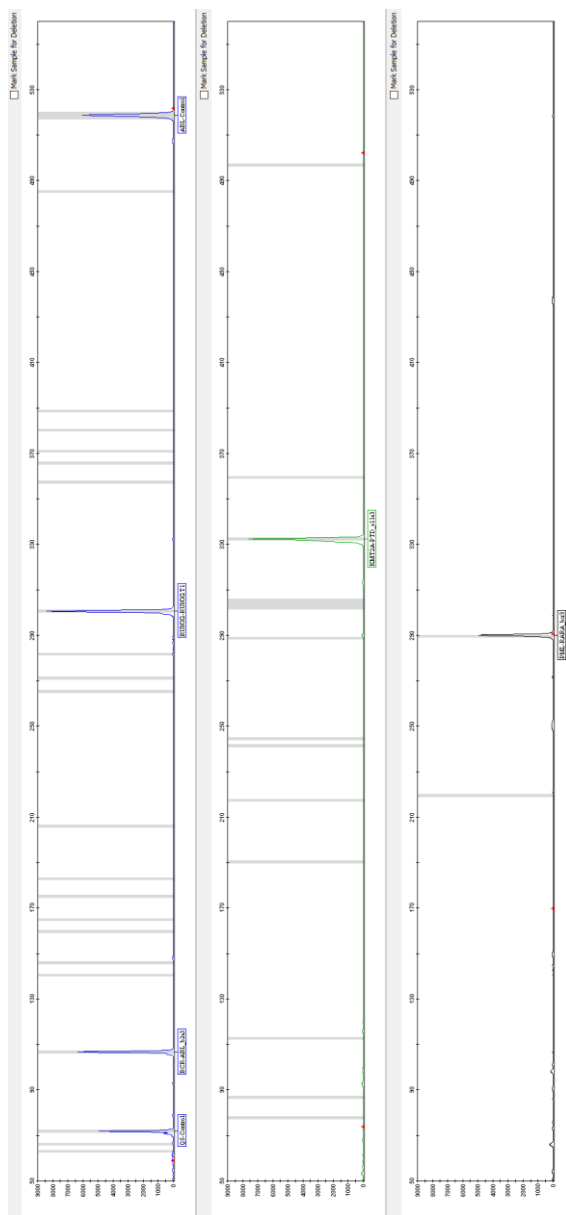


Figure 3 Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control (PC)

No template control (NTC)

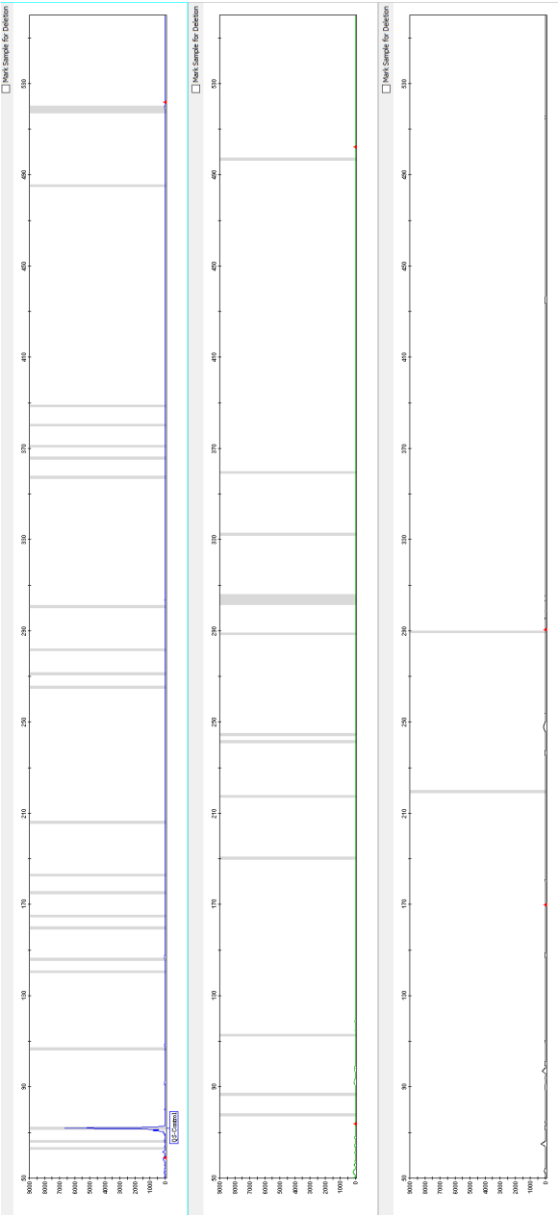


Figure 4 No template control (NTC)

BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Tel.: +49 351 8838 400

Fax: +49 351 8838 403

www.biotype.de

Ordini

sales@biotype.de

Servizio e assistenza clienti

support@biotype.de

