

Mentype[®] AMLplex^{QS}

PCR Amplification Kit

Mode d'emploi



0483

Pour le diagnostic in vitro

AMLIFU02v2fr

23/07/2025



45-12100-0025

45-12100-0100

45-12100-0400



Code du lot



BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Site website : www.biotype.de

E-mail : support@biotype.de

Commande : sales@biotype.de



BIOTYPE

Avis de modification

Veuillez noter les adaptations suivantes par rapport à la version précédente du mode d'emploi :

Code du document	Modifications	Date
AMLIFU02v1fr	Version initiale	28/05/2025
AMLIFU02v2fr	Mise à jour du tableau 8	23/07/2025

Une version imprimée de ce mode d'emploi peut être fournie gratuitement dans un délai de 7 jours.

N'hésitez pas à nous contacter si vous avez d'autres questions au +49 351 8838 400 ou à l'adresse e-mail support@biotype.de

Contenu

Contexte scientifique	4
Description du produit	5
Matériel fourni	7
Description des composants.....	8
Stockage et manipulation des réactifs	9
Matériel et dispositifs requis mais non fournis	9
Équipement général de laboratoire	9
Réactifs, kits et consommables.....	10
Instruments et logiciel	11
Échantillons et échantillons de test.....	13
Avertissements et précautions à prendre	13
Note à l'attention de l'utilisateur	14
Procédure	15
Aperçu du flux de travail expérimental	15
Préparation des échantillons.....	15
Préparation du contrôle	19
Préparation du mélange maître.....	19
Amplification de la PCR	22
Électrophorèse capillaire sur gel	23
Préparation des PCR produits	23
Analyse de la longueur des fragments.....	24
Analyse des données	27
Procédure générale d'analyse des données.....	27
Analyse des échantillons.....	30
Analyse des données avec GeneMapper™ ID-X	33
Dépannage.....	37

Évaluation des performances.....	40
Contrôle qualité.....	50
Assistance technique.....	51
Références.....	51
Restrictions d'utilisation	52
Informations sur les commandes	53
Marques et clauses de non-responsabilité	54
Explication des symboles.....	55
Annexe	57

Usage prévu

Le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit est un essai manuel destiné au dépistage qualitatif de 11 fusions génétiques avec un total de 34 variantes de transcription, permettant l'identification d'aberrations chromosomiques ayant une importance diagnostique, pronostique et thérapeutique chez les patients adultes atteints ou suspectés d'être atteints de leucémie myéloïde aiguë (AML).

L'essai doit être utilisé avec l'DNA (cDNA) complémentaire qui a été transcrit à l'envers à partir d'RNA cellulaire extrait d'échantillons de sang total veineux périphérique ou de moelle osseuse.

Le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit est utilisé pour détecter les aberrations chromosomiques afin de prendre des décisions cliniques pertinentes dans le cas de la leucémie myéloïde aiguë. L'identification des translocations génétiques spécifiques permet de classer les maladies leucémiques et fournit des informations essentielles pour établir un diagnostic et déterminer le traitement adapté au risque de chaque patient.

Le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit est destiné aux utilisateurs professionnels de laboratoire formés aux techniques de génétique moléculaire, à la PCR multiplexe et à la manipulation de l'Genetic Analyzer de Thermo Fisher Scientific (division Applied Biosystems).

Contexte scientifique

La vérification d'aberrations chromosomiques spécifiques a une grande valeur pronostique dans presque tous les types de leucémie aiguë. Les preuves biologiques moléculaires d'aberrations chromosomiques (translocations) constituent un complément diagnostique important. La détection des translocations spécifiques permet de classer les maladies leucémiques et fournit des informations essentielles pour déterminer le traitement adapté au risque des patients.

Le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit facilite la détection des aberrations chromosomiques les plus courantes observées à ce jour dans le cas de la AML et constitue un outil de dépistage simple à utiliser, compatible avec les routines et fiable.

Description du produit

Le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit contient des réactifs optimisés pour la détection haute résolution de 11 gènes de fusion avec 34 variantes de transcription au total (voir [Tableau 1](#)). La dénomination des variantes suit les nomenclatures établies historiquement, en particulier pour KMT2A (Schnittger et al., 2000). Une liste complète des gènes, leurs noms alternatifs et les identifiants de transcription utilisés pour les descriptions systématiques des variantes figure en annexe (voir [Liste des gènes cibles](#)).

Le kit de test comprend un contrôle de la PCR interne (Quality Sensor “QS-Control”) indépendant de la matrice et un contrôle de l’cDNA dépendant de la matrice (ABL-Control) qui fournissent des informations utiles sur l’efficacité de la PCR, la qualité des matrices d’cDNA appliquées et la présence d’inhibiteurs de la PCR.

Le test est réalisé par analyse de fragments à l’aide d’une électrophorèse capillaire sur gel. Une amorce pour chaque transcrit est marquée par fluorescence avec 6-FAM, BTG ou BTY, les spectres de couleur de l’accessoire Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE, GmbH).

Tableau 1 Fusions génétiques et variantes de transcription détectables avec le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit

Fusion génétique	Aberration chromosomique	Variante	Description systématique des variantes
RUNX1::RUNX1T1	t(8;21) (q22;q22.1)	-	RUNX1:e6::RUNX1T1:e3
BCR::ABL	t(9;22) (q34.1;q11.2)	e1a3	BCR:e1::ABL1:e3
		e1a2	BCR:e1::ABL1:e2
		b3a2	BCR:e14::ABL1:e2
		b3a3	BCR:e14::ABL1:e3
		b2a2	BCR:e13::ABL1:e2
		b2a3	BCR:e13::ABL1:e3
PICALM::MLLT10	t(10;11) (p12.3;q14.2)	MLLT10_240-PICALM_1987	MLLT10:e3::PICALM:e19
		MLLT10_240-PICALM_2092	MLLT10:e3::PICALM:e20
CBFB::MYH11	inv(16) (p13.1;q22)	Type A	CBFB:e5::MYH11:e33
		Type B	CBFB:e5::MYH11:e32
		Type C	CBFB:e5::MYH11:e31
		Type D	CBFB:e5::MYH11:e29
		Type E	CBFB:e5::MYH11:e28

Fusion génétique	Aberration chromosomique	Variante	Description systématique des variantes
		Type F	CBFB:e4::MYH11:e33
		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;q21.1)	bcr1	PML:e6::RARA:e3
		bcr2	PML:e5::RARA:e3
		bcr3	PML:e3::RARA:e3

L'essai a été validé par un dépistage de fusion génétique réalisé sur ~ 300 patients souffrant de AML et son adéquation a été confirmée dans le cadre d'une étude d'évaluation clinique comparative.

La limite de détection pour l'évaluation qualitative est de 400 RFU. En moyenne, au moins 1 000 copies peuvent être détectées pour chaque fusion génétique.

La plage de dosage générale dans des conditions standard pour la réaction de transcription inverse est définie comme étant comprise entre 100 ng et 1 µg au total d'RNA isolé à partir de sang total ou de moelle osseuse.

La dose optimale pour la transcription inverse dans la moelle osseuse est définie comme étant de 500 ng d'RNA et de 1 µg d'RNA pour le sang périphérique. 1 µL d'cDNA est ensuite utilisé pendant la PCR.

Matériel fourni

Tableau 2 Contenu du Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit

Réactif	Couleur du capuchon		Volume par taille d'emballage		
			25 réactions	100 réactions	400 réactions
Nuclease-Free Water	Bleu clair		1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Violet		125 µL	500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® AMLplex ^{QS} Primer Mix	Rouge		63 µL	250 µL	4 x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Blanc		10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Positive Control	Blanc		25 µL	25 µL	25 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Orange		13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Allelic Ladder	Vert		25 µL	25 µL	4 x 25 µL

Un aperçu des numéros de lot du composant figure sur l'étiquette située à l'intérieur du rabat de la boîte.

REMARQUE

i

Veuillez noter que la taille de l'emballage correspond au nombre de tests **sans** tenir compte du nombre de contrôles requis ou de l'excédent nécessaire pour le pipetage.

Nous recommandons d'utiliser la taille suivante pour le débit correspondant :

- < 8 échantillons par série de PCR : taille de l'emballage 25 réactions
- 8 à 45 échantillons par série de PCR : taille de l'emballage 100 réactions
- > 45 échantillons par série de PCR : taille de l'emballage 400 réactions

Description des composants

Nuclease-Free Water: PCR, utilisée dans la préparation de la PCR et comme contrôle sans matrice (NTC).

Tampon de **Reaction Mix A:** PCR contenant des dNTPs et du MgCl₂. Le tampon PCR est optimisé pour favoriser l'activité enzymatique pour la PCR.

Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix : mélange d'amorces oligonucléotidiques multiplexes contenant une amorce marquée (marqueur : 6-FAM™, BTG, BTY) et des amorces non marquées.

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

Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control : mélange artificiel d'ADN à double brin de cinq fragments d'ADN. Il est utilisé comme contrôle de PCR externe qualitatif, positif pour les cibles suivantes sur les 3 panels : BCR::ABL_b2a3, RUNX1::RUNX1T1, ABL-control, KMT2A-PTD_e11e3 et PML::RARA_bcr3, en outre, QS-Control est amplifié comme marqueur de qualité pour la validité de l'échantillon.

REMARQUE

i

Le Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control n'est pas critique pour les professionnels de laboratoire, car il s'agit de molécules d'ADN individuelles qui ont été purifiées, sont inoffensives et n'ont aucune fonction biologique active. Il ne contient aucune cellule vivante ni aucun organisme pathogène susceptible de constituer une menace directe.

DNA Size Standard 550 (BTO): : mélange de fragments PCR marqués par un fluorophore dont la longueur est comprise entre 60 et 550 pb. Le composant est ajouté à chaque produit de PCR avant l'analyse de la longueur des fragments. Il est utilisé pour une régression de taille afin de déterminer avec précision la longueur des fragments des produits de PCR.

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder : mélange de fragments PCR marqués par un fluorophore représentant tous les allèles détectables du Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit. Il comprend 22 fragments

marqués au 6-FAM™, 12 fragments marqués au BTG et 2 fragments marqués au BTY, utilisés comme référence de génotypage pour l'identification exacte des allèles.

Stockage et manipulation des réactifs

Le kit est expédié dans de la glace carbonique. Les composants du kit doivent arriver congelés, à l'exception de l'Multi Taq 2 DNA Polymerase qui est conservé dans un tampon empêchant la congélation du réactif.

Vérifiez que le kit est complet à la réception. N'utilisez pas les kits qui étaient décongelés à leur arrivée. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés, ou si les tubes ou l'emballage ont été endommagés pendant le transport, les performances ne peuvent être garanties.

Conservez tous les composants entre -25 °C et -15 °C, à l'abri de la lumière. Le Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix, DNA Size Standard 550 (BTO) et l'Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder doivent notamment être conservés à l'abri de la lumière.

Afin d'éviter toute contamination, nous recommandons de conserver et d'utiliser les composants de préamplification (échantillons d'RNA et d'cDNA, Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control) et les composants de postamplification (DNA Size Standard 550 (BTO) et Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder) sont stockés et utilisés séparément des réactifs PCR (Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A et Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix).

Le kit expirera conformément aux informations figurant sur l'étiquette de l'emballage ou 24 mois après ouverture, selon la première éventualité. Ne dépassez pas un maximum de 20 cycles de congélation-décongélation.

Matériel et dispositifs requis mais non fournis

Équipement général de laboratoire

- Centrifugeuse de paillasse avec un rotor pour tubes de réaction de 2 ml et 200 µL
- Centrifugeuse avec rotor pour plaques de microtitrage pour plaques de réaction à 96 puits

- Mélangeur à vortex
- Pipettes calibrées et réglables avec embouts filtrants jetables étanches aux aérosols
- Plaques de réaction à 96 puits de 200 µL ou tubes de réaction de 200 µL avec matériel de fermeture correspondant, qualité PCR
- Supports adaptés aux tubes de réaction de 2 ml et 200 µL
- Support de refroidissement adapté aux tubes de 2 ml
- Gants jetables non poudrés
- NanoDrop™ One Spectrophotometer ou Qubit™ Fluorometer

REMARQUE



Tout le matériel utilisé pour la PCR doit être de qualité appropriée (exempt d'ADN et destiné à la biologie moléculaire). Assurez-vous que tous les instruments utilisés ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus conformément aux instructions et recommandations du fabricant.

Réactifs, kits et consommables

Tableau 3 Réactifs requis mais non fournis

Il convient de noter que certains réactifs et consommables sont utilisés dans des combinaisons spécifiques et ne sont pas tous nécessaires pour chaque série.

Réactif	Fournisseur	Numéro de commande
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 préparations)	Macherey-Nagel	740201.50
Maxwell® CSC RNA Blood Kit (48 préparations)	Promega	AS1410

Réactif	Fournisseur	Numéro de commande
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific	4374966 4374967
SuperScript™ IV First Strand cDNA Synthesis System	Thermo Fisher Scientific	18091050, 18091200
Hi-Di™ Formamide, 25 mL	Thermo Fisher Scientific	4311320
POP-4™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 samples)	Thermo Fisher Scientific	4393715
POP-7™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 samples)	Thermo Fisher Scientific	4393708
Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series	Thermo Fisher Scientific	4393927
Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series	Thermo Fisher Scientific	4408256
3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 36 cm	Thermo Fisher Scientific	4404683
3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 50 cm	Thermo Fisher Scientific	4404685
SeqStudio™ Cartridge	Thermo Fisher Scientific	A33671 A41331
SeqStudio™ Cathode Buffer	Thermo Fisher Scientific	A33401

Instruments et logiciel

Outre les méthodes d'extraction manuelles basées sur des colonnes décrites au chapitre Préparation des échantillons, l'automatisation suivante peut être utilisée pour l'extraction d'RNA :

- Dispositif Maxwell® CSC (N° de cat. : AS6000, Promega)

Le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit a été validé pour être utilisé avec les thermocycleurs PCR suivants :

- ProFlex PCR System (N° de cat. : 4484073 (bloc d'échantillons 3 x 32 puits), 4484075 (bloc d'échantillons 96 puits), Thermo Fisher Scientific)
- GeneAmp® PCR System 9700 Aluminium (arrêté, Thermo Fisher Scientific)
- Mastercycler nexus gradient (N° de cat. : 6331000017, Eppendorf AG)
- Mastercycler es-S (arrêté, Eppendorf AG)

- Biometra Tadvanced (N° de cat. : 846-2-070-211, Analytik Jena)

L'utilisation d'autres thermocycleurs PCR que ceux mentionnés ci-dessus doit être validée par l'utilisateur. Les spécifications suivantes doivent être respectées :

- Couvercle chauffant
- Bloc adapté aux plaques/tubes de réaction de 200 µL
- Montée en température réglable à 4 °C/s

Le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit a été validé pour être utilisé avec les thermocycleurs PCR suivants :

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

L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel :

- GeneMapper™ ID-X software, version 1.6 (Thermo Fisher Scientific), utilisant les éléments suivants spécifiques au produit :
 - Analysis Methods: AMLplexIVD_Analysis1_v1x ou AMLplexIVD_Analysis4_v1x ou AMLplexIVD_Analysis7_v1x
 - Bins: AMLplexIVD_Bins1_v1x ou AMLplexIVD_Bins4_v1x ou AMLplexIVD_Bins7_v1x
 - Panels: AMLplexIVD_Panel1_v1x ou AMLplexIVD_Panel4_v1x ou AMLplexIVD_Panel7_v1x
 - Size Standard: BTO_60-550_v1x

Une évaluation manuelle des fichiers fsa ou de tout résultat fourni avec le logiciel de collecte de données sans le logiciel décrit pour l'analyse et l'évaluation des données n'est pas validée.

REMARQUE



Assurez-vous que tous les instruments utilisés ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus conformément aux instructions et recommandations du fabricant.

Échantillons et échantillons de test

Les échantillons suivants ont été validés avec le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit :

- Échantillons de sang veineux périphérique humain (EDTA, citrate, héparine et RNA Exact stabilisateur), conservés à 4 °C et traités pour la purification de l'RNA dans les 24 heures.
- Échantillons de moelle osseuse (EDTA, héparine), conservés à 4 °C et traités pour la purification de l'RNA dans les 24 heures.

L'RNA obtenu doit être conservé non dilué à une température comprise entre -85 °C et -70 °C.

REMARQUE



Veuillez vous assurer que l'anticoagulant utilisé pour le prélèvement sanguin est compatible avec les instructions du fabricant du kit d'isolement d'RNA.

Avertissements et précautions à prendre

- Lisez attentivement le mode d'emploi avant d'utiliser le produit.
- Lisez les fiches de données de sécurité (SDS) et les déclarations de non-danger (NHS) pour tous les produits BIOTYPE, disponibles sur demande ou sur notre site (www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter). Pour les produits qui ne nécessitent pas de SDS car ils ne contiennent pas de SVHC ou sont soumis à d'autres restrictions du règlement 1272/2008 (CLP), BIOTYPE fournit les SDS sur demande.
- Veuillez contacter les fabricants de matériel et réactifs requis, mais non fournis, pour obtenir des copies des SDS pour tout réactif supplémentaire nécessaire.
- Les composants des différents lots de kits ne doivent pas être mélangés.

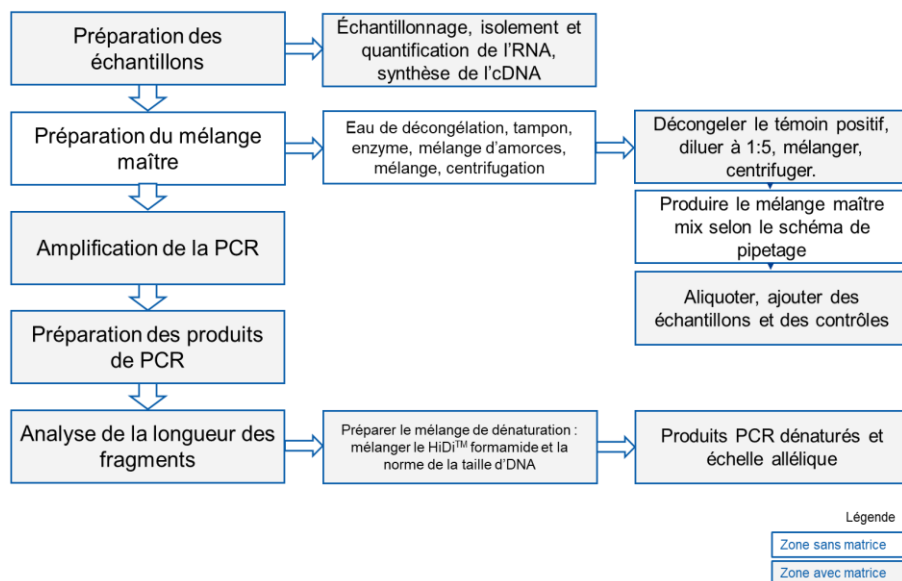
- L'aliquotage des composants du kit dans d'autres récipients de réaction n'est pas autorisé.
- L'utilisation de ce produit est limitée aux utilisateurs de laboratoire professionnels formés aux techniques de génétique moléculaire, à la PCR multiplexe et à la manipulation des Genetic Analyzers de Thermo Fisher Scientific.
- Avant la première utilisation, vérifiez le produit et ses composants pour vous assurer de ce qui suit :
 - Intégrité
 - Exhaustivité en termes de nombre, de type et de remplissage (voir chapitre Matériel fourni)
 - Étiquetage correct
 - Congélation à la réception (à l'exception de l'Multi Taq 2 DNA Polymerase)
- Les échantillons doivent toujours être traités comme infectieux et/ou présentant un risque biologique, conformément aux procédures de sécurité en laboratoire.
- N'utilisez pas un kit dont la date de péremption est dépassée.
- Éliminez l'échantillon et les déchets de l'essai conformément à la réglementation locale en matière de sécurité et de mise au rebut.
- Tous les instruments utilisés ont été installés, calibrés, vérifiés et entretenus conformément aux instructions et recommandations du fabricant.

Note à l'attention de l'utilisateur

Tout problème survenant en rapport avec le produit doit être signalé par l'utilisateur au fabricant. Tout incident grave lié à ce kit doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente des États membres dans lesquels l'utilisateur et/ou le patient se trouvent. Un résumé des caractéristiques de sécurité et des performances (SSP) est établi conformément à l'article 29 du règlement (EU) 2017/746 et destiné à fournir un accès, via la base de données EUDAMED, à un résumé actualisé des données relatives à la sécurité et aux performances du dispositif, dans le cas de ce produit, uniquement aux professionnels de laboratoire.

Procédure

Aperçu du flux de travail expérimental



Préparation des échantillons

Exigences relatives aux échantillons bruts

L'échantillon pour le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit est défini comme étant de l'cDNA transcrit à partir de l'RNA extrait du sang total veineux périphérique ou de la moelle osseuse prélevés chez l'être humain.

Nous recommandons l'utilisation de réactifs pour la stabilisation de l'RNA pendant le prélèvement des échantillons. Les stabilisateurs d'RNA aident à préserver l'intégrité de l'RNA (par exemple S-Monovette RNA Exact). L'isolement de l'RNA doit être effectué rapidement après le prélèvement des échantillons.

REMARQUE



Un stockage prolongé du matériel brut peut entraîner une fragmentation du matériel génétique et, par conséquent, une qualité insuffisante de matériel. Cela peut détériorer le résultat de l'analyse, par exemple en raison de signaux affaiblis ou de contrôles internes non valides.

Sang

Prélevez au moins 200 µL d'échantillon de sang total veineux périphérique pour la procédure suivante.

La manipulation de sang total veineux périphérique doit suivre les recommandations de la guideline MM05–A2 (2nd edition), du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) qui stipule que le sang total peut être conservé à température ambiante (entre 22 °C et 25 °C) pendant 24 heures maximum, ou entre 2 °C et 6 °C pendant 72 heures ou plus. De plus, il est recommandé d'utiliser des anticoagulants tels que l'EDTA, le citrate ou l'héparine pour le prélèvement de sang total.

Moelle osseuse

Prélevez au moins 200 µL d'échantillon de moelle osseuse pour la procédure suivante.

La manipulation des aspirats de moelle osseuse doit suivre les recommandations de la CLSI guideline MM05–A2 (2nd edition) qui stipule que les aspirats de moelle osseuse anticoagulés (EDTA ou citrate) doivent être conservés et transportés à 4 °C. Pour obtenir les meilleurs résultats, l'RNA doit être extrait dans un délai de 1 à 4 heures après le prélèvement.

Extraction de l'RNA

Réalisez l'extraction et la purification de l'RNA à partir du sang total périphérique (PB) ou des aspirats de moelle osseuse (BM) à l'aide de l'un des kits suivants :

- RNeasy® Midi/ Mini/ Plus Mini Kit (Qiagen GmbH) pour les anticoagulants EDTA, citrate et héparine sur la BM et le PB

- NucleoSpin® Dx RNA Blood (Macherey-Nagel) pour l'RNA Exact stabilisateur sur le PB
- Maxwell® CSC RNA Blood Kit (Promega) pour les anticoagulants EDTA et héparine sur la moelle osseuse

Veillez suivre les manuels et recommandations du fabricant pour l'extraction de l'RNA. Il est recommandé d'effectuer une **digestion** de l'**DNase** pendant l'isolement conformément aux instructions du fabricant.

REMARQUE



La contamination sanguine peut être détectée visuellement dans la réaction PCR ou dans l'RNA isolé par un changement de couleur orange. Si un changement de couleur est observé, nous recommandons de répéter l'isolement de l'RNA afin d'éviter toute interférence potentielle.

REMARQUE



Veillez à éliminer toute trace d'éthanol avant l'élution de l'acide nucléique. L'éthanol est un puissant inhibiteur de la PCR.

Quantification and dilution de l'RNA

Quantifiez la concentration d'RNA par spectroscopie UV/VIS à 260 nm à l'aide du NanoDrop™ One spectrophotometer ou par spectroscopie de fluorescence à l'aide du Qubit™ Fluorometer.

Lorsque vous utilisez la spectrophotométrie, utilisez le tampon d'élution du kit d'extraction d'RNA pour mesurer le blanc. Le rapport A_{260}/A_{280} doit être compris entre 1,9 et 2,1, tandis que le rapport A_{260}/A_{230} doit être compris entre 1,8 et 2,3.

Pour la quantification fluorométrique de l'RNA, le Qubit™ Fluorometer avec soit le Qubit™ RNA HS Assay-Kit, soit le Qubit™ RNA BR Assay-Kit peut être utilisé.

Pour une utilisation avec le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit, diluez les échantillons d'RNA à une concentration appropriée pour la transcription ultérieure en cDNA. Préparez la dilution juste avant utilisation. Utilisez une eau exempte de nucléase comme diluant.

REMARQUE



La plage de dosage pour la transcription en cDNA suit les instructions du fabricant du kit de transcription. L'utilisation de 100 ng à 1 µg d'RNA dans un volume réactionnel final de 20 µL pour la synthèse d'cDNA est validée pour les deux types d'échantillons. Nous recommandons d'utiliser une quantité optimale de **500 ng pour la moelle osseuse** et de **1 µg pour le sang périphérique**.

Stockage de l'RNA

Conservez les échantillons d'RNA non dilués dans de l'eau exempte d'RNAase à une température comprise entre -25 °C et -15 °C pendant 24 heures maximum ou entre -85 °C et -70 °C pendant un an maximum.

Transcription en cDNA

Effectuer la synthèse de l'ADNc conformément aux instructions du fabricant, en utilisant l'un des kits suivants:

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

*recommandé pour une faible quantité d'RNA

REMARQUE



L'**inactivation thermique** de la transcriptase inverse est cruciale pour les performances de la PCR. Veuillez vous reporter aux instructions du fabricant pour plus de détails.

Stockage de l'cDNA

Conservez les échantillons d'cDNA à une température comprise entre -25 °C et -15 °C pendant un an maximum.

Préparation du contrôle

Contrôle positif PC

Décongelez le Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control, homogénéisez-le soigneusement par vortexage, puis centrifugez brièvement.

Diluez le Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control à 1:5 en utilisant l'Nuclease-Free Water incluse dans le kit. Par exemple, mélangez 1 µL du contrôle avec 4 µL d'Nuclease-Free Water.

Homogénéisez le PC dilué en agitant soigneusement au vortex. Ensuite, centrifugez brièvement le PC dilué (pendant environ 5 s).

Ne conservez pas le contrôle positif dilué.

REMARQUE



Utilisez toujours une dilution fraîche du Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control.

Contrôle sans matrice NTC

Utilisez l'eau exempte de nucléase incluse dans le kit comme contrôle sans matrice NTC à la place d'un échantillon.

Préparation du mélange maître

Retirez et décongelez les composants suivants du Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit :

- Nuclease-Free Water (capuchon bleu clair)
- Reaction Mix A (capuchon violet)
- Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix (capuchon rouge)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (capuchon blanc)

Tous les composants congelés doivent être décongelés à température ambiante (entre 22 °C et 25 °C, pendant environ 30 minutes, à l'abri de la lumière) et homogénéisés en retournant les tubes, en pipetant ou en les agitant doucement au vortex. Ensuite, centrifugez brièvement les réactifs (pendant environ 5 s). Avant la préparation du mélange maître, il est recommandé de conserver l'Multi Taq 2 DNA Polymerase dans un environnement frais aussi longtemps que possible (par exemple sur une grille de refroidissement).

REMARQUE

Mélangez l'Multi Taq 2 DNA Polymerase en agitant rapidement pour une meilleure stabilité – **n'agitez pas l'enzyme au vortex.**

Préparez le mélange maître PCR conformément au Tableau 4 dans un tube de microcentrifugation de taille appropriée pour le nombre total d'échantillons à tester dans une zone propre réservée à cet effet. Incluez au moins un PC et un NTC dans votre calcul.

REMARQUE

En règle générale, si vous testez moins de 10 échantillons, utilisez suffisamment de mélange maître pour un échantillon supplémentaire. Si vous testez 10 échantillons ou plus, utilisez un volume de mélange maître de réactif excédentaire de +10 %.

Tableau 4 Préparation de la réaction du mélange maître PCR

Composant	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

Composant	Volume		
	N°1	N°5	N°10
Matrice d'cDNA ou échantillon de contrôle*	1,0 µL	5 x 1,0 µL	10 x 1,0 µL
Volume total	25,0 µL	125,0 µL	250,0 µL

*La dose de matrice peut être augmentée à 2 µL, pour cela, le volume d'eau exempte de nucléase doit être ajusté.

Mélangez le mélange maître en agitant doucement au vortex, puis centrifugez-le brièvement.

Aliquotez 24,0 µL du mélange maître PCR dans des tubes PCR de 200 µL préparés et centrifugez brièvement les tubes fermés.

Utilisation des matrices d'cDNA et des contrôles

Ajoutez 1,0 µL des types d'échantillons suivants dans les tubes PCR préparés contenant le mélange maître PCR.

NTC : ajoutez 1,0 µL d'Nuclease-Free Water à la place d'un échantillon.

Échantillon d'cDNA : ajoutez 1,0 µL des échantillons d'cDNA non dilués.

PC : ajoutez 1,0 µL du Mentype® AMLplex^{QS} Positive Contro préparé et dilué à 1:5 à la place d'un échantillon.

REMARQUE



Tout d'abord, préparez le NTC afin d'éviter toute contamination du contrôle. Préparez le PC en dernier afin d'éviter toute contamination croisée des échantillons.

REMARQUE



Utilisez au moins un contrôle positif PC et un contrôle sans matrice NTC par série. Sinon, la série ne peut pas être validée.

Fermez tous les tubes PCR, agitez doucement au vortex et centrifugez.

Amplification de la PCR

Programmez le thermocycleur PCR avec le profil d'amplification suivant, en veillant à régler la vitesse de montée en température à 4 °C/s. Effectuez une PCR « hot start » afin d'activer la polymérase et d'empêcher la formation de produits d'amplification non spécifiques.

REMARQUE



Il est essentiel d'utiliser des thermocycleurs PCR calibrés et bien entretenus, car les écarts peuvent avoir un impact négatif sur l'amplification de cibles sensibles, telles que KMT2A::MLLT4.

Tableau 5 Protocole PCR

Température	Temps
96 °C	4min (hot start pour l'activation de la polymérase)
96 °C	30 s
60 °C	120 s 25 cycles
72 °C	75 s
68 °C	10 min*
10 °C	∞ en permanence

*Si un pic d'adénine négatif (-1 bp) plus élevé est observé, il est possible de prolonger jusqu'à 60 minutes.

REMARQUE



Si des thermocycleurs avec vitesses de chauffage et de refroidissement réglables sont utilisés, la **montée en température doit être réglée à 4 °C/s** afin d'obtenir un équilibre optimal du kit.

REMARQUE

Pour obtenir des informations de base concernant la préparation, la programmation et la maintenance des différents instruments de PCR, veuillez vous reporter au manuel d'utilisation de l'instrument concerné.

Électrophorèse capillaire sur gel

Préparation des PCR produits

Une fois la PCR terminée, retirez les échantillons du thermocycleur et centrifugez-les brièvement.

REMARQUE

Une fois la PCR terminée, les produits de PCR peuvent être conservés pendant 4 semaines à une température comprise entre 2 °C et 8 °C ou à long terme à une température comprise entre -25 °C et -15 °C à l'abri de la lumière.

Décongelez, mélangez et centrifugez les réactifs :

- Hi-Di™ Formamide (non inclus dans le kit)
- Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder (capuchon vert)
- DNA Size Standard BTO (550) (capuchon orange)

Préparez le mélange de dénaturation décrit dans le [Tableau 6](#) et ajoutez une ou deux réactions pour compenser les variations de pipetage. Ajoutez une réaction supplémentaire pour l'échelle allélique.

Tableau 6 Mélange de dénaturation

Composant	Volume par réaction
Hi-Di™ Formamide	12,0 µL
DNA Size Standard BTO (550)	0,5 µL

Pipetez 12,0 µL du mélange de dénaturation dans les puits d'une plaque PCR (adaptée à une utilisation dans l'Genetic Analyzer).

Ajoutez soit 1,0 µL de produit de PCR, soit 1,0 µL d'Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder dans les puits. Scellez la plaque PCR avec une feuille d'aluminium appropriée, agitez au vortex et centrifugez brièvement la plaque.

REMARQUE



L'échelle allélique est utilisée pour déterminer correctement les fragments analysés lors de l'analyse des données. Lors de chaque analyse de la longueur des fragments, l'échelle allélique doit être analysée au moins une fois afin de garantir la bonne analyse des données.

REMARQUE



Les capillaires de l'appareil d'électrophorèse sur gel ne doivent jamais être secs. Si les échantillons n'occupent pas toutes les positions capillaires, remplissez les puits supplémentaires de la plaque avec 12,0 µL de Hi-Di™ Formamide en fonction du nombre de capillaires.

Dénaturez les produits de PCR préparés dans un thermocycleur PCR pendant 3 minutes à 95 °C, puis refroidissez les échantillons à 4 °C dans le thermocycleur. Centrifugez brièvement les échantillons avant l'analyse de la longueur des fragments.

Analyse de la longueur des fragments

Avant d'effectuer la première analyse de longueur des fragments, lancez **Matrix Standard BT5 multi** (BIOTYPE GmbH) pour effectuer un alignement spectral des colorants fluorescents utilisés pour le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit (6-FAM™, BTG, BTY, BTO).

REMARQUE

Reportez-vous au mode d'emploi de Matrix Standard BT5 multi pour son installation. Il est disponible sur www.biotype.de/en/ifus ou sur demande via l'adresse e-mail support@biotype.de de BIOTYPE GmbH..

Une fois que Matrix Standard BT5 multi a été exécuté avec succès, importez les paramètres de l'instrument fournis pour l'3500 Genetic Analyzer comme décrit dans le **Tableau 7** (www.biotype.de/en/template-files).

Tableau 7 Fichiers fournis pour les Genetic Analyzers
(www.biotype.de/en/template-files)

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

Les spécifications relatives au protocole requis pour les instruments sont décrites dans le **Tableau 8**. Seuls les paramètres décrits doivent être ajustés, les autres paramètres doivent rester dans leur configuration par défaut. Suivez le mode d'emploi du fabricant pour régler les paramètres de fonctionnement spécifiques.

Tableau 8 Paramètres pour les modules d'exécution des différents appareils d'électrophorèse capillaire sur gel

	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	1 560
SeqStudio™ Genetic Analyzer	1,2	10	9	1 560

Contrairement aux valeurs indiquées dans le Tableau 8, la durée d'exécution peut être ajustée afin de s'assurer que tous les fragments (60 à 550 pb) de la DNA Size Standard 550 (BTO) sont analysés.

Pour configurer un Size Standard protocol, les tailles suivantes pour la DNA Size Standard 550 (BTO) doivent être attribuées au panel orange :

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 et 550 bp.

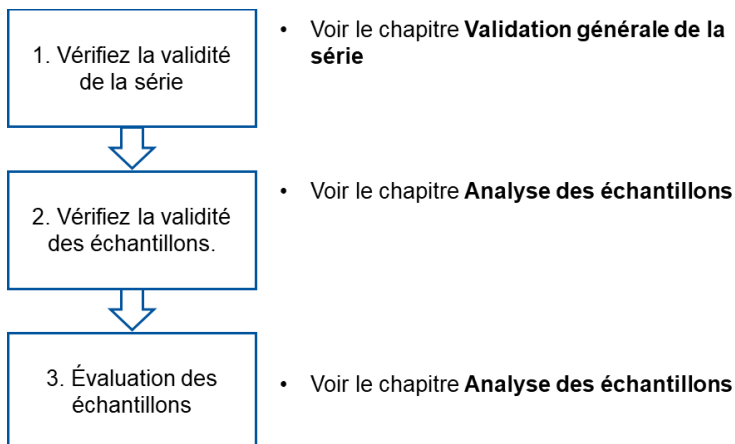
REMARQUE



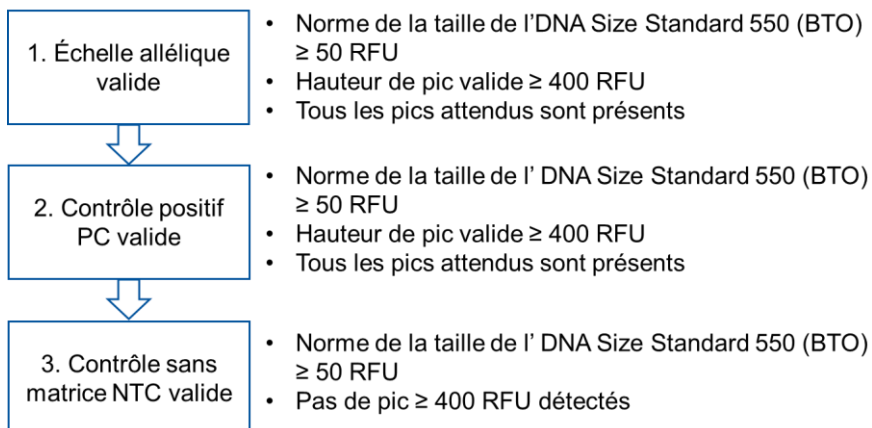
BIOTYPE GmbH fournit des modèles spécifiques pour l'installation facile de paramètres d'exécution spécifiques pour l'analyse de la longueur des fragments, ainsi que des modèles d'analyse pour une configuration simple du logiciel GeneMapper™ ID-X.. Ces modèles sont disponibles au téléchargement sur : www.biotype.de/en/template-files.

Analyse des données

Procédure générale d'analyse des données



Validation générale de la série



REMARQUE



La plage de mesure complète comprise entre 50 et 560 pb doit être analysée afin d'évaluer la validité.

DNA Size Standard 550 (BTO)

La détermination de la longueur exacte des produits amplifiés dépend du type de dispositif, des conditions d'électrophorèse et de la norme utilisée pour la taille de l'ADN. En raison de la complexité de certaines cibles, la détermination de la taille doit être basée sur des références réparties de manière uniforme.

Vérifiez la DNA Size Standard 550 (BTO) dans tous les échantillons selon les critères suivants :

- Présence de tous les fragments à : **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 et 550 bp** (voir la [Figure 1](#))
- Tous les fragments sont présents avec des valeurs ≥ 50 RFU
- Coefficient de détermination $R^2 > 0,995$
(voir l'Size Match Editor de GeneMapper ID-X)
- La hauteur maximale des fragments ne diminue pas de façon continue avec l'augmentation de la longueur des fragments.

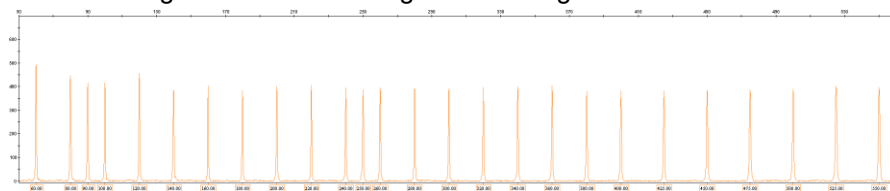


Figure 1 Électrophérogramme des fragments de la DNA Size Standard 550 (BTO), dont les longueurs sont exprimées en pb

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder

Après avoir vérifié que la norme de taille est valide, vérifiez que tous les pics de l'échelle allélique sont présents avec des valeurs ≥ 400 RFU.

REMARQUE



L'Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder comprend un pic pour chaque cible détectable. Comparez les allèles avec l'annexe [Figure 2](#).

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

Après avoir vérifié que la norme de la taille est valide, assurez-vous que tous les pics spécifiques pour le PC sont présents avec des valeurs **≥ 400 RFU**. Le Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control qui fait partie du kit de test représente les allèles suivants (voir le [Tableau 9](#)).

Tableau 9 Pics de contrôle dans le Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control

Panel	Pic de contrôle
Bleu	▪ QS-Control ▪ BCR::ABL_b2a3 ▪ RUNX1::RUNX1T1 ▪ ABL-Control
Vert	▪ KMT2A-PTD_e11e3
Jaune	▪ PML::RARA_bcr3

REMARQUE



Le Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control comprend au moins un pic pour chaque panel utilisé. Comparez les allèles avec l'annexe [Figure 3](#).

No template control (NTC)

Après avoir vérifié que la norme de taille est valide, vérifiez qu'aucun pic avec une valeur **≥ 400 RFU** n'est détecté dans le NTC (voir l'annexe [Figure 4](#)).

REMARQUE



En utilisant GeneMapper ID-X avec les fichiers modèles fournis pour la méthode d'analyse, les pics < 400 RFU des échantillons du Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit ne sont pas automatiquement attribués au nom de l'allèle, ce qui vous aide à évaluer facilement le NTC.

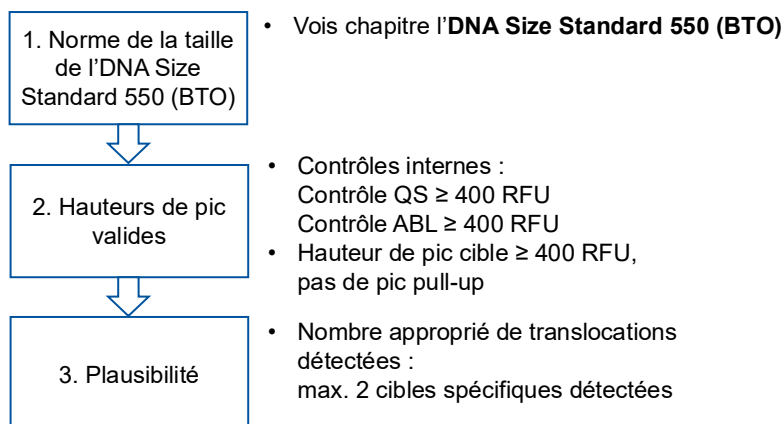
REMARQUE



Des artefacts tels que de petites taches de colorant peuvent apparaître de manière plus prononcée dans le NTC. En raison de la large base du pic, de sa forme anormale et de l'absence d'attribution, il est possible de le différencier des pics d'amplicons.

Analyse des échantillons

Analyse des données du flux de travail



REMARQUE



Si plusieurs détections de cibles dépassent le seuil ou si vous avez des doutes, veuillez consulter la section Dépannage (par exemple pour obtenir une liste des combinaisons de signaux connues) ou contacter le service clients à l'adresse e-mail support@biotype.de.

En utilisant le logiciel GeneMapper™ ID-X software avec les modèles spécifiques fournis par BIOTYPE GmbH, la validation de base est effectuée automatiquement.

Après avoir vérifié la validité de la série et de l'échantillon, les données de l'échantillon doivent être évaluées.

REMARQUE



Le Mentype® AMLplex^{QS} est un **test exclusivement qualitatif**. Cette application n'est pas adaptée pour quantifier le nombre de copies ou surveiller la maladie résiduelle minimale (MRD).

Lorsque vous utilisez les modèles d'évaluation de BIOTYPE GmbH et que l'évaluation de l'échelle allélique de la série est réussie, les fragments PCR détectés sont nommés automatiquement. Un aperçu des longueurs de fragments des produits PCR est présenté dans le [Tableau 10](#) ci-dessous.

Tableau 10 Aperçu des longueurs de fragments des translocations dans l'Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder sur le polymère POP-4™. ‡ Deux amplicons pour la variante KMT2A::MLLT3_6A, * Bien que cette variante soit détectable avec le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit,, la longueur variable de l'amplicon (environ 173 pb) empêche l'attribution automatique.

Panel/translocation	Longueur [bp]	Panel/translocation	Longueur [bp]
FAM Panel (canal bleu)		BTG Panel (canal vert)	
CBFB::MYH11_TypeG	63	DEK::NUP214	78

Panel/translocation	Longueur [bp]	Panel/translocation	Longueur [bp]
CBFB::MYH11_TypeI	66	KMT2A-PTD_e9e3	87
QS-Control	72	KMT2A::MLLT3_6A_S†	113
BCR::ABL_b2a3	107	KMT2A::MLLT3_6B	190
CBFB::MYH11_TypeJ	141	KMT2A-PTD_e10e3	217
CBFB::MYH11_TypeC	146	KMT2A::ELL_e10e3	241
CBFB::MYH11_TypeD	160	KMT2A::MLLT3_7A	245
CBFB::MYH11_TypeH	165	KMT2A::ELL_e10e2	289
CBFB::MYH11_TypeF	175	KMT2A::MLLT4	303
BCR::ABL_b3a3	183	KMT2A-PTD_e11e3	332
BCR::ABL_e1a3	206	KMT2A::MLLT3_8A	359
MLLT10_240:: PICALM_2092	265	KMT2A::MLLT3_6A_L†	497
CBFB::MYH11_TypeA	271	BTY Panel (canal jaune)	
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		

Analyse des données avec GeneMapper™ ID-X

Préparation du GeneMapper™ ID-X software

Pour obtenir des instructions générales sur l'application et l'analyse des échantillons avec ce logiciel, consultez le manuel d'utilisation du GeneMapper™ ID-X Software.

L'attribution des allèles doit être effectuée à l'aide du logiciel d'analyse GeneMapper™ ID-X en combinaison avec les fichiers modèles du Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit de BIOTYPE GmbH. Les fichiers modèles BIOTYPE (voir le [Tableau 11](#)) sont disponibles au téléchargement sur notre page d'accueil (www.biotype.de/en/template-files) ou sur demande via l'adresse e-mail support@biotype.de. Le flux de travail de l'analyse à l'aide du GeneMapper™ ID-X software est présenté sur le [Tableau 12](#).

Tableau 11 Modèles BIOTYPE GmbH pour le GeneMapper™ ID-X Software, des modèles spécifiques pour les ¹POP-1™, ²POP-4™ and ³POP-7™ polymer

Modèle	Nom du modèle	
Panels*	AMLplexIVD_Panel1_v1x ¹ AMLplexIVD_Panel4_v1x ² AMLplexIVD_Panel7_v1x ³	ou des versions ultérieures
BinSets*	AMLplexIVD_Bins1_v1x ¹ AMLplexIVD_Bins4_v1x ² AMLplexIVD_Bins7_v1x ³	ou des versions ultérieures
Size Standard*	BTO_60-550_v1x	ou des versions ultérieures
Analysis Method*	AMLplexIVD_Analysis1_v1x ¹ AMLplexIVD_Analysis4_v1x ² AMLplexIVD_Analysis7_v1x ³	ou des versions ultérieures
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 Alleles	
	Table for 10 Alleles	

*Ces modèles doivent toujours être utilisés pour l'analyse des données. Les autres fichiers modèles sont facultatifs.

REMARQUE**i**

L'importation et l'appel d'allèles à l'aide des fichiers modèles fournis ne sont garantis que si le GeneMapper™ ID-X software est utilisé. Lorsque le GeneMapper™ software est utilisé, vous pouvez rencontrer des problèmes d'importation avec certains fichiers modèles. Vous devrez peut-être ajuster les Panels et les Bins à l'aide d'une ou plusieurs séries de l'échelle allélique sur votre configuration d'instrument spécifique. Contactez-nous pour obtenir de l'aide (support@biotype.de).

Tableau 12 Flux de travail d'analyse des données avec GeneMapper™ ID-X

N°	Icône	Étape de travail
1		Préparation du logiciel
		Panel Manager Importez les fichiers modèles fournis pour les éléments Panels et les Bins
		GeneMapper™ ID-X Manager Importez le modèle fourni pour la Analysis Method et la Size Standard
2		Importation d'échantillons
		Add Samples to Project - recherchez le dossier de la série, sélectionnez-le et Add to List → Add
3		Analyse des échantillons

N°	Icône	Étape de travail										
		Sélectionnez les propriétés suivantes dans les colonnes appropriées de la feuille modèle, puis choisissez Analyze .										
		<table><tr><th>Nom de la colonne</th><th>Sélection</th></tr><tr><td>Sample Type</td><td>Échelle allélique, contrôle positif, contrôle négatif ou échantillon</td></tr><tr><td>Analysis Method</td><td>Sélectionnez le modèle BIOTYPE précédemment importé AMLplexIVD_Analysis_v1x</td></tr><tr><td>Panel</td><td>Sélectionnez le modèle BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x</td></tr><tr><td>Size Standard</td><td>Sélectionnez le modèle BIOTYPE template BTO_60-550_v1x</td></tr></table>	Nom de la colonne	Sélection	Sample Type	Échelle allélique, contrôle positif, contrôle négatif ou échantillon	Analysis Method	Sélectionnez le modèle BIOTYPE précédemment importé AMLplexIVD_Analysis_v1x	Panel	Sélectionnez le modèle BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x	Size Standard	Sélectionnez le modèle BIOTYPE template BTO_60-550_v1x
Nom de la colonne	Sélection											
Sample Type	Échelle allélique, contrôle positif, contrôle négatif ou échantillon											
Analysis Method	Sélectionnez le modèle BIOTYPE précédemment importé AMLplexIVD_Analysis_v1x											
Panel	Sélectionnez le modèle BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x											
Size Standard	Sélectionnez le modèle BIOTYPE template BTO_60-550_v1x											
4	Contrôles de vérification											
		Validité des contrôles de vérification (échelle allélique, contrôle positif, contrôle négatif) Si les hauteurs de pics sont suffisantes, l'attribution est effectuée conformément aux spécifications de la Analysis Method										
5	Évaluation des échantillons											
		Vérifiez la validité des échantillons. Si les hauteurs de pics sont suffisantes, l'attribution est effectuée conformément aux spécifications de la Analysis Method										

REMARQUE

i

À l'aide des fichiers modèles fournis pour les éléments Analysis Method, Bins, Panels, et en sélectionnant le type d'échantillon correspondant, la validité de ces échantillons est automatiquement vérifiée par le logiciel. Les indicateurs de contrôle qualité SOS (Sample off-Scale), SQ (Sizing Quality), OMR (Outside Marker Range) doivent être des cases vertes pour indiquer que la validité est acceptée.

ARNM	SOS	SQ	SSPK	MIX	OMR	CGQ
						

REMARQUE

i

Utilisez l'Size Match Editor de GeneMapper™ ID-X pour évaluer la norme de la taille. Si l'appel automatique des fragments a échoué, les triplets 80 / 90 / 100 pb et 240 / 250 / 260 pb peuvent être utilisés pour orienter l'affectation manuelle des pics.

Dépannage

Pour une détection précise et fiable des cibles, une analyse post-PCR, comprenant l'attribution et la validation automatiques des cibles, doit être effectuée à l'aide du GeneMapper ID-X software validé en combinaison avec les fichiers modèles de BIOTYPE. En cas de doute, contactez support@biotype.de.

Pics de remontée

Des pics de remontée peuvent apparaître si les hauteurs des pics se situent en dehors de la plage de détection linéaire ou si une matrice incorrecte a été appliquée. Ils apparaissent à des positions correspondant à des pics spécifiques dans d'autres canaux de couleurs, généralement avec des intensités de signal plus faibles. Cet effet doit être pris en compte dans les cas de profils d'amplification élevés des cibles suivantes :

- PML::RARA bcr3 (canal jaune) entraînant un pic de remontée dans KMT2A::ELL e10e2 (canal vert)
- RUNX1::RUNX1T1 (canal bleu) entraînant un pic de remontée dans KMT2A::MLLT4 (canal vert, seulement si un POP-7TM Polymer a été utilisé)

Ajout de nucléotides indépendant de la matrice

En raison de son activité de transférase terminale, l'Multi Taq 2 DNA Polymerase a tendance à ajouter un radical adénosine à l'extrémité 3' des fragments d'ADN amplifiés. Le pic de l'artefact est plus court d'une base que prévu (pics de -1 pb). Toutes les amorces BIOTYPE sont conçues pour minimiser ces artefacts. La formation d'artefacts est encore réduite par le prolongement optionnel de l'étape finale d'extension du protocole PCR à 68 °C pendant 60 minutes. La hauteur du pic de l'artefact est corrélée à la quantité d'cDNA. Les laboratoires doivent définir leurs propres limites pour l'analyse des pics.

Artefacts

La température ambiante peut influencer les performances des produits de PCR sur les instruments multi-capillaires. Des pics secondaires ou fractionnés apparaissent. En outre, l'attribution automatisée pourrait être influencée dans certains cas. Si ces effets se produisent, nous

recommandons d'injecter à nouveau l'échantillon à une température ambiante plus élevée. Envisagez toujours d'utiliser des consommables frais conformément aux recommandations du fabricant.

Influence des polymères

Le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit a été validé et certifié pour l'analyse sur le POP-4TM polymer. L'utilisation d'autres polymères (par exemple POP-7TM ou POP-1TM)) a été vérifiée mais peut influencer le comportement de certains produits de PCR. De plus, le bruit de fond peut augmenter en raison du comportement différent des colorants fluorescents libres.

Écarts de pipetage

L'analyse de robustesse du Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit a révélé que le kit est robuste face à des écarts mineurs par rapport au protocole décrit (+/- 10 % d'écart). Un écart moyen (+/- 20 %) par rapport au protocole expérimental décrit peut être plus critique pour l'analyse. Il est essentiel de prêter attention aux écarts moyens de -20 % dans les composants PCR, car ils réduisent considérablement la hauteur du signal. Les cibles les plus sensibles dans ce contexte sont KMT2A::MLLT4 et DEK::NUP214.

Pour minimiser les écarts, nous recommandons d'utiliser des pipettes calibrées, de pipeter avec précision et de bien mélanger.

Faible ABL - pics de contrôle

Le contrôle interne ABL forme l'amplicon le plus long du Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit et constitue donc un marqueur essentiel pour le contrôle qualité. En cas de faible hauteur de pic du ABL-control, l'une des causes suivantes est la plus probable :

Dose de matrice trop faible dans la réaction : veuillez déterminer la concentration d'RNA et augmenter l'entrée de synthèse d'cDNA si nécessaire.

RNA fragmenté, c'est-à-dire que des amplicons plus petits provenant des cibles peuvent être positifs, mais le contrôle ABL interne est manquant. Vérifiez le processus de préparation des échantillons afin de détecter toute

contamination par RNAase. La fragmentation de l'RNA est un phénomène connu qui se produit dans les échantillons archivés.

Synthèse d'cDNA inefficace : veillez à respecter les instructions du fabricant lors de la synthèse d'cDNA. Utilisez l'un des kits de synthèse d'cDNA validés décrits dans le chapitre Transcription en cDNA.

L'échantillon est compromis par la présence d'une enzyme transcriptase inverse active : veillez à suivre les instructions du fabricant, en particulier en ce qui concerne l'étape d'inactivation par la chaleur pendant la synthèse d'cDNA.

Amplicons supplémentaires ou doubles positifs

La majorité des échantillons prélevés sur les patients devraient présenter un résultat négatif ou positif pour une translocation. Le fait d'avoir plusieurs translocations est un résultat inhabituel qui peut nécessiter une vérification supplémentaire. Cependant, certaines combinaisons ont déjà été observées dans des échantillons de patients, telles que les suivantes :

Le BCR::ABL b2a3 cible peut apparaître avec une hauteur de pic relativement faible s'il existe une forte amplification pour le ABL-control ou toute autre variante de transcription du BCR::ABL (environ 5 à 10 % du résultat de la cible principale).

Le KMT2A partial tandem domain (KMT2A-PTD) est connu pour se produire simultanément avec d'autres translocations et dans des réarrangements complexes pouvant apparaître positifs pour plusieurs variantes KMT2A-PTD.

Lorsque vous utilisez le POP7TM-Polymer, la translocation CBFB::MYH11 de Type A peut entraîner un signal non spécifique pour RUNX1::RUNX1T1 et CBFB::MYH11 de Type F. Le pic de RUNX1::RUNX1T1 est considéré comme hors échelle lors de l'utilisation du polymère POP4 et peut être vérifié à l'aide de la lignée cellulaire ME-1. Les deux pics secondaires non spécifiques présentent une hauteur de pic RFU inférieure à celle de CBFB::MYH11 de Type A. Lorsque vous utilisez le POP7TM-Polymer, un pic hors échelle non spécifique peut être attribué à une translocation CBFB::MYH11 de Type I avec des hauteurs de pic inférieures à 2000 RFU.

Le KMT2A::MLLT4 cible apparaît avec deux longueurs d'amplicon différentes en fonction de la prévalence spécifique à l'échantillon des

variantes de transcription. La plupart des échantillons de patients présentent les deux amplicons avec une différence de longueur de trois nucléotides sous forme de double pic dans la classification cible du KMT2A::MLLT4. Ce résultat est valide, aucune mesure corrective n'est nécessaire.

Toute translocation de KMT2A peut se produire avec le point de rupture dans l'exon 9 (le plus fréquent) ou dans les exons 10 et 11 (rare). Tout pic important hors échelle dans le canal vert peut provenir d'une translocation de KMT2A atypique et peut être vérifié à l'aide d'autres méthodes.

La variante de transcription de KMT2A::MLLT3 cible 6A peut produire deux amplicons détectables en cas de dose très élevée et de qualité d'RNA très élevée, les pics correspondants sont 6A_S (short, obligatoire) et 6A_L (long, facultatif). Il s'agit d'un phénomène nécessaire inhérent à la conception des amorces du Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit. Ce résultat est valide, aucune mesure corrective n'est nécessaire.

Un pic hors échelle dans le canal jaune entre les classifications de PML::RARA bcr1 et bcr3 est très probablement causé par une variante de PML::RARA bcr2. Cette cible comporte plusieurs points de rupture dans l'exon 6 PML et ne peut donc être attribuée à aucune classification spécifique.

Évaluation des performances

Sensibilité analytique

Le type d'échantillon pour le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit est défini comme étant de l'cDNA transcrit à partir de l'RNA cellulaire isolé du sang total veineux périphérique ou de l'aspirat de moelle osseuse. Pour l'RNA d'échantillons sanguins compris entre 50 ng et 1000 ng, la mesure est possible avec une hauteur de pic suffisante du contrôle de l'ABL en utilisant le cDNA synthesis kits SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) et le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) validés lors de cette évaluation des performances. En supposant une efficacité de transcription de 100 %, cela donne une plage de concentration d'cDNA comprise entre 2,5 ng/μL et 50 ng/μL ; 1 μL d'cDNA est utilisé dans la réaction PCR. Pour l'RNA d'échantillons de moelle osseuse compris entre 50 ng et 1000 ng en utilisant

le SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) et entre 100 ng et 1000 ng en utilisant le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), la mesure est possible avec une hauteur de pic suffisante du contrôle de l'ABL. En supposant une efficacité de transcription de 100 %, cela donne une plage de concentration d'cDNA de 2,5 ng/μL comprise respectivement entre 5 ng/μL et 50 ng/μL ; 1 μL d'cDNA est utilisé dans la réaction PCR. La dose d'RNA optimale est définie comme étant de 1000 ng pour les échantillons de sang total périphérique et de 500 ng pour les échantillons de moelle osseuse. Dans le cas d'échantillons présentant une faible concentration d'RNA ou des cibles critiques, la dose d'cDNA dans la PCR peut être augmentée jusqu'à 4 μL pour la transcription d'cDNA avec le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), quel que soit le type d'échantillon. Pour l'cDNA transcrit avec le SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific), la dose d'cDNA est limitée à un maximum de 2 μL.

La Limit of Blank (LoB) a été testée sur 12 échantillons provenant de différentes sources, à la quantité de dosage optimale préalablement définie. Comme aucun pic non spécifique n'a été détecté au-dessus du seuil de 400 RFU dans la plage allant de 55 pb à 550 pb dans aucun des 12 échantillons testés, un seuil de 400 RFU peut être fixé.

La Limit of Detection (LoD) du Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit a été testée avec 6 échantillons artificiels avec un fond d'cDNA couvrant toutes les paires d'amorces dans le mélange d'amorces avec des paires d'amorces détectant plusieurs cibles amplifiant la variante de transcription la plus longue et donc la plus difficile à détecter.

Le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit a révélé une limite de détection acceptable selon les critères d'acceptation, avec une LoD maximale de 400 copies pour les cibles testées (voir [Tableau 13](#)), à l'exception du KMT2A::MLLT4 qui a tout de même donné un résultat acceptable avec une LoD de 1 000 copies. Étant donné que toutes les variantes de transcription des fusions génétiques détectables n'ont pas pu être testées, une LoD globale de 1 000 copies, qui correspond au résultat le plus élevé obtenu pour les cibles testées, est considéré comme pouvant être appliqué en toute sécurité.

Tableau 13. LoD pour le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit.

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

Étant donné que le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit est un test qualitatif conçu pour déterminer la présence ou l'absence de l'analyte cible, le test de la Limit of Quantitation (LoQ) n'est pas considéré comme pertinent pour l'usage prévu.

Spécificité analytique

Nous avons testé l'appel automatique des allèles à l'aide de l'échelle allélique et la concordance de l'attribution des allèles par rapport aux échantillons artificiels des cibles de translocation à l'aide du GeneMapper™ ID-X software. Sur la base des résultats, les paramètres spécifiques au test pour le génotypage par électrophorèse capillaire (bins et panels) du Genetic Analyzer sont définis.

Les amorces PCR sont conçues pour se lier de manière complémentaire à la séquence d'ADN de référence officielle du génome humain. Les variantes génétiques telles que le Single Nucleotide Polymorphism (SNPs, INDELs ou délétions) peuvent affecter la liaison spécifique des amorces et ont été évaluées à partir des entrées de la base de données dbSNP pertinentes pour le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit. Une seule entrée (rs73504425) entraîne la perte de la fonction d'amorce. L'allèle de la variante est présent chez 0,6 % de la population africaine et se situe dans le site de liaison de l'amorce pour le PICALM::MLLT10, un gène de fusion rarement signalé dont la prévalence est inférieure à 1 %.

De plus, une recherche BLAST a été effectuée sur le transcriptome humain pour le Mentype® AMLplex^{QS} Primer mix et n'a donné aucun produit d'amplification non spécifique dans la plage allant de 0 à 600 pb.

Précision and fidélité

La précision analytique du Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit repose sur les résultats d'études de fidélité réalisées sur le kit. BIOTYPE GmbH participe activement à un programme d'External Quality Assessment (EQA) depuis 2013. La présence ou l'absence d'une translocation dans les échantillons est déterminée à partir du consensus des résultats de tous les participants à cette EQA. Au total, 68 échantillons ont été analysés depuis 2013.

Sur la base de ces résultats, une matrice de contingence a été créée à partir de la comparaison des résultats du Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit (positifs/négatifs) et des résultats réels (positifs/négatifs), confirmés par le consensus de tous les participants au External Quality Assessment program. Conformément à la norme CLSI EP12 (3e édition), les indicateurs

de performance clés présentés dans le Tableau 14 ont été calculés à partir de la matrice de contingence.

Tableau 14 Caractéristiques analytiques du Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit.

Caractéristiques analytiques	Estimation	Intervalle de confiance inférieur à 95 %	Intervalle de confiance supérieur à 95 %
Sensibilité analytique	92,2 %	81,5 %	96,9 %
Spécificité analytique	94,1 %	73,0 %	99,0 %
Valeur prédictive positive	97,9 %	89,1 %	99,6 %
Valeur prédictive négative	80,0 %	58,4 %	91,9 %
Précision	92,6 %	83,9 %	96,8 %

Ces calculs fournissent une mesure complète de la capacité du Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit à classer correctement les cas positifs et négatifs avec une probabilité respective de 92 % et 94 %. La proportion globale de résultats corrects est de 93 %, ce qui démontre une grande fiabilité. Le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit démontre une performance analytique élevée, validant l'efficacité et la fiabilité de l'essai.

Précision

Nous avons évalué la répétabilité et la reproductibilité de l'essai sur la base de la norme ISO 5725-2:2022-05 et de la directive CLSI EP05 (3e édition). Cinq échantillons artificiels et le Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control ont été évalués dans le cadre d'une étude multisite 5 x 5 x 3 (jour x réplique x site). L'étude multisite examine la principale source de variation (répétabilité et reproductibilité) due aux différents sites testés qui présenteront différents opérateurs effectuant des mesures à différents endroits à l'aide d'instruments différents. La répétabilité obtenue variait entre 8,3 % CV et 15,6 % CV et la reproductibilité variait entre 14,6 % CV et 30,5 % CV. Dans l'ensemble, le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit présente une

précision acceptable avec un $SD_{Rep} \leq 2500$ RFU pour toutes les fusions génétiques spécifiques testées avec les échantillons artificiels 1 à 5 et pour le Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control.

Limite de l'essai

Le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit utilise la détection qualitative des fusions génétiques par PCR de point final. Ainsi, l'une des limites pertinentes de l'essai est la hauteur minimale du pic permettant de distinguer de manière fiable le bruit de fond technique de la détection réelle de la cible. La valeur limite de la hauteur du pic a été fixée à 400 RFU à partir des données issues des tests de sensibilité analytique.

Interférents et réactions croisées

Les interférents susceptibles d'influencer les résultats de la procédure de mesure ont été évalués conformément aux recommandations des directives CLSI EP07 (3e édition) et EP37 (1re édition). Pour le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit les interférents endogènes et exogènes ont été déterminés, leur concentration maximale attendue (C_{max}) dans la réaction PCR, telle que suggérée dans les directives, a été testée et, en cas d'interférence, d'autres concentrations ont été testées afin de déterminer la concentration à laquelle aucune interférence n'est détectable.

Les résultats n'ont montré aucun effet interférant de l'interférent endogène de l'ADN testé à 1 ng dans la réaction PCR, lorsque la digestion d'ADN a été effectuée dans le cadre du traitement des échantillons.

En ce qui concerne le sang interférant endogène, un effet interférant a été observé à la concentration calculée C_{max} de 0,87 % v/v dans la réaction PCR, d'autres dilutions ont été testées jusqu'à ce qu'aucune interférence ne soit détectable. La concentration 0,087 % v/v de sang n'a montré aucune interférence. Cependant, la contamination sanguine peut être détectée visuellement dans la réaction PCR ou dans la suspension d'ARN isolé par un changement de couleur orange. Si un changement de couleur est observé, nous recommandons de répéter l'isolement de l'ARN afin d'éviter toute interférence potentielle.

Pour les interférents exogènes DTT, RNase Inhibitor, DNase, Ethanol, Metoclopramide, EDTA, Hydroxyurea et Citrate, aucun effet d'interférence

n'a été observé à leur $C_{\max}$ respective, où les écarts par rapport au groupe non traité observés pour les échantillons testés se situaient dans les limites acceptées.

En ce qui concerne les interférences exogènes, une interférence de la transcriptase inverse, de l'héparine et de la protéinase K a été observée à la $C_{\max}$ calculée respective ou recommandée par la directive CLSI EP37 (1^{re} édition), d'autres dilutions ont été testées jusqu'à ce qu'aucune interférence ne soit détectable. Pour la transcriptase inverse de l'enzyme, la $C_{\max}$ testée de 0,2 % v/v a montré une interférence, sauf si l'enzyme est inactivée par la chaleur conformément aux instructions du fabricant des kits de synthèse d'cDNA testés. Pour l'héparine 3,3 U/dl et pour l'enzyme protéinase K 0,0001 % v/v, aucune interférence n'a été observée.

Les anticoagulants sanguins EDTA, citrate de sodium et héparine ont également été testés avec les kits d'isolement recommandés. Aucun impact sur les performances analytiques n'a été détecté. Nous prévoyons que le flux de travail des kits d'isolement permettra d'éliminer efficacement toutes les substances interférentes testées provenant des anticoagulants et des réactifs d'isolement de l'RNA.

Tableau 15 Concentrations testées sans interférence d'interférents endogènes et exogènes

Type d'interfèrent	Catégorie	Interférent	Concentration testée sans interférence
Endogène	Composants de sang total	Sang total	0,087 % v/v dans la réaction PCR
Exogène	Anticoagulants	EDTA	0,099 mg/dl
		Citrate	0,004 % v/v dans la réaction PCR
		Héparine	3,3 U/dl
	Réactifs d'isolement de l'RNA	Proteinase K	0,0001 % v/v dans la réaction PCR
		Éthanol	0,3 % v/v dans la réaction PCR
		DNase	0,16 % v/v dans la réaction PCR
	Réactifs de transcription	DTT	0,2 % v/v dans la réaction PCR

Type d'interfèrent	Catégorie	Interfèrent	Concentration testée sans interférence
	inverse de l'cDNA	RNase Inhibitor	0,2 % v/v dans la réaction PCR
		Transcriptase inverse	0,2 % v/v dans la réaction PCR (désactivé par la chaleur)
	Agent antiémétique	Metoclopramide	0,225 mg/dl
	Agent antinéoplasique	Hydroxyurea	3,08 mg/dl

Stabilité en cours d'utilisation

Toutes les études de stabilité ont été planifiées conformément à la norme ISO 23640:2015 et à la directive CLSI EP25-(2e édition). La procédure suivante a été suivie pour toutes les études de stabilité : Le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit a été testé à plusieurs moments et pendant différentes durées. Les échantillons artificiels et le Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control ont été analysés. L'évaluation finale des différentes conditions comprenait la comparaison entre les moyennes du point de départ (T_0) et les points temporels consécutifs (T_n) et a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

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

Pour l'étude sur la stabilité en cours d'utilisation, deux expériences ont été réalisées. Une pour tester la stabilité après plusieurs cycles de congélation et décongélation et une pour tester la stabilité des kits lors d'une utilisation simulée après ouverture dans le cadre de l'étude sur la stabilité de la durée de conservation après congélation et décongélation.

D'après les résultats, le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit est stable pendant pour jusqu'à 20 cycles de congélation et décongélation et peut être utilisé pendant 24 mois maximum après ouverture.

Données sur les performances cliniques

Conception de l'étude, aspects éthiques et réglementaires

Le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit et les méthodes de référence ont été testées sur des échantillons prélevés sur 297 patients et 10 volontaires en bonne santé. L'objectif de cette étude était de fournir des preuves cliniques conformément aux § 20 à 24 de la loi sur les dispositifs médicaux « Medizinproduktegesetz ». À l'aide des méthodes de référence cytogénétiques (FISH) et/ou de qPCR monoplexe validée en interne, il a fallu prouver la concordance avec le dispositif. La confirmation de la commission d'éthique responsable a été reçue le 5 juin 2012.

Méthodes de référence

L'objectif principal est de déterminer la sensibilité et la spécificité diagnostiques par rapport aux méthodes de référence. Comme méthode de référence, l'Fluorescence-In-Situ-Hybridization (FISH) normalisée a été réalisée pour une sélection de translocations [Grimwade et al. Blood 116: 354-65, 2010]. Les translocations non détectables par cytogénétique ont été testées à l'aide de tests monoplex-nested-PCR établis et validés dans le laboratoire de test [Steudel *et al.* Genes Chromosomes Cancer 37: 237-51, 2003, van Dongen *et al.* Leukemia 13: 1901-28, 1999].

Extraction et purification de l'RNA

Les cellules mononucléaires (MNC) ont été recueillies à partir des échantillons par centrifugation avec gradient de densité. Par la suite, l'isolement total de l'RNA et la transcription inverse en ADNc ont été réalisées à l'aide de kits disponibles dans le commerce. La qualité de l'cDNA a été analysée à l'aide d'une PCR en temps réel. Des essais PCR uniques validés ont permis de confirmer les gènes de fusion et les mutations.

Résultats

Le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit n'a donné aucun résultat faussement positif avec l'cDNA testé sur les 10 volontaires en bonne santé.

Sur les 297 échantillons de patients testés, 5 n'ont pas pu être évalués en raison de la détection du contrôle ABL interne en dessous du seuil

recommandé. Sur les 292 échantillons restants, 201 ont donné des résultats négatifs vrais par rapport aux méthodes de référence.

Les résultats individuels des tests comparatifs sont résumés dans le Tableau 16. Les fusions génétiques PICALM::MLLT10 (CALM-AF10) et KMT2A::MLLT4 (MLL-AF6) n'ont pas pu être évaluées en termes de sensibilité du diagnostic, car aucun échantillon pré-caractérisé positif n'était disponible.

Dans l'ensemble, une sensibilité du diagnostic de 94 % et une spécificité du diagnostic de 99,5 % ont été obtenues.

Tableau 16 Conclusion des résultats des données sur les performances cliniques du Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit.

*Les données sur la prévalence ont été tirées de Grimwade et al. 2010. n.e. = non évaluées

Biomarqueur			Évaluation des performances cliniques (n=292)						
Fusion génétique	Aberration chromosomique	Variante	Prév* [%]	Vrai positif	Vrai négatif	Faux positif	Faux négatif	Sensibilité du diagnostic [%]	Spécificité du diagnostic [%]
RUNX1::RUNX1T1	t(8;21) (q22;q22)	n. b.	7	16	275	0	1	94,1	100,0
	BCR::ABL	e1a3	1	1	291	0	0	100,0	100,0
		(q34;q11) e1a2							
		b3a2							
		b3a3							
		b2a2							
		b2a3							
PICALM::MLLT10	t(10;11) (p13;q14)	MLLT10_240-PICALM_1987	1	0	292	0	0	n.e.	100,0
		MLLT10_240-PICALM_2092							
CBFB::MYH11	inv(16)	Type A	5	28	262	0	2	93,3	100,0
		(p13;q22) Type B							
		Type C							
		Type D							
		Type E							
		Type F							
		Type G							
		Type H							
		Type J							
DEK::NUP214	t(6;9) (p23;q34)	n. b.	1	3	289	0	0	100,0	100,0
KMT2A::MLLT4	t(6;11) (q27;q23)	n. b.	< 0,5	0	292	0	0	n.e.	100,0
KMT2A::MLLT3	t(9;11)	6A (6A_S; 6A_L)	1	4	287	0	1	80,0	100,0
	(p22;q23)	7A							

Biomarqueur			Évaluation des performances cliniques (n=292)						
Fusion génétique	Aberration chromosomique	Variante	Prév* [%]	Vrai positif	Vrai négatif	Faux positif	Faux négatif	Sensibilité du diagnostic [%]	Spécificité du diagnostic [%]
8A									
6B									
KMT2A:: ELL	t(11;19)	e10e2	1	0	290	1	1	0,0	99,7
	(q23;p13.1)	e10e3							
KMT2A-PTD	Partiel	e9e3	5-7	23	269	0	0	100,0	100,0
	Tandem	e10e3							
	Duplication	e11e3							
NPM1:: MLF1	t(3;5)	n. b.	< 0,5	2	290	0	0	100,0	100,0
	(q25.1;q34)								
PML:: RARA	t(15;17)	bcr1	13	8	284	0	0	100,0	100,0
	(q22;q21)	bcr2							
		bcr3							
Résumé			37	85	201	1	5	94,4	99,5

Évaluation du diagnostic

Les caractéristiques de performances cliniques du Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit ont donné des résultats acceptables. Les paramètres d'évaluation des performances cliniques ont été calculés conformément à l'annexe I, section 9.1b du règlement (UE) 2017/746 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro, tel qu'affiché dans le [Tableau 17](#).

Tableau 17 Caractéristiques du diagnostic du Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit

Caractéristiques du diagnostic	Estimation	Intervalle de confiance inférieur	Intervalle de confiance supérieur
Sensibilité du diagnostic	94,4 %	87,7 %	97,6 %
Spécificité du diagnostic	99,5 %	97,3 %	99,9 %
Valeur prédictive positive	98,8 %	93,7 %	99,8 %
Valeur prédictive négative	97,6 %	94,4 %	99,0 %
Précision du diagnostic	98,0 %	95,6 %	99,1 %

Contrôle qualité

Tous les composants du kit sont soumis à un processus de contrôle qualité rigoureux chez BIOTYPE GmbH. La qualité des kits de test est contrôlée en permanence afin de garantir une utilisation sans restriction. N'hésitez pas à nous contacter si vous avez d'autres questions concernant l'assurance qualité.

Assistance technique

Pour obtenir des conseils techniques, contactez notre équipe d'assistance clients :

e-mail : support@biotype.de

Téléphone : +49 (0)351 8838 400

Références

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, Haeflrich 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.

Restrictions d'utilisation

- Les procédures décrites dans ce manuel doivent être suivies à la lettre. Tout écart peut entraîner l'échec du test ou donner des résultats erronés.
- L'utilisation de ce produit est réservée aux utilisateurs professionnels en laboratoire ayant reçu une formation spécifique sur les techniques de PCR et l'électrophorèse capillaire sur gel.
- Des procédures appropriées de prélèvement, de transport, de conservation et de traitement des échantillons sont nécessaires pour garantir la performance optimale de ce test.
- Cet essai ne doit pas être utilisé directement sur l'échantillon. Des méthodes appropriées d'extraction d'acide nucléique doivent être utilisées avant d'utiliser cet essai.
- Le kit a uniquement été validé pour une utilisation avec les réactifs, les instruments et le logiciel répertoriés au chapitre Matériel et dispositifs requis mais non fournis
- Le Mentype® AMLplex^{QS} a été conçu, validé et certifié comme outil de dépistage pour la classification des sous-types de la LAM. Cette application n'est pas adaptée pour quantifier le nombre de copies comme la surveillance de la Minimal Residual Disease (MRD) ou pour valider d'autres sous-types de leucémies ou de LAM pédiatrique.
- En raison de la variabilité génétique, le single nucleotide polymorphism (SNPs) ou le insertion deletion polymorphism (INDELs) courte peut affecter l'efficacité de l'amorce ou l'accessibilité de la matrice. Une analyse de la version la plus récente de l'assemblage du génome humain (HG38) pour tous les groupes ethniques n'a révélé qu'un seul SNP critique entraînant une perte de la fonction d'amorce. L'allèle de la variante est présent chez 0,6 % de la population africaine et se situe dans le site de liaison de l'amorce pour le PICALM::MLLT10, un gène de fusion rarement signalé dont la prévalence est inférieure à 1 %. Cependant, en raison de la faible prévalence de la fusion génétique combinée à la faible probabilité d'apparition de SNP dans la population mondiale, le risque de résultats faussement négatifs est faible. En cas

de doute, envisagez de confirmer les résultats à l'aide de méthodes de référence.

- De bonnes pratiques de laboratoire sont requises pour garantir les performances du kit.
- Les résultats doivent être interprétés par un professionnel de santé qualifié.
- L'interprétation des résultats doit tenir compte de la possibilité de résultats faussement négatifs et faussement positifs.
- N'utilisez pas de composant périmé ou mal conservé.

Informations sur les commandes

Envoyez vos commandes par e-mail à l'adresse sales@biotype.de.

Produit	Taille de l'emballage	Numéro de commande
Mentype® AMLplex ^{QS} PCR Amplification Kit	25 réactions	45-12100-0025
	100 réactions	45-12100-0100
	400 réactions	45-12100-0400
Matrix Standard BT5 multi	1 x 25 µL	45-15100-0025
	2 x 25 µL	45-15100-0050

Marques et clauses de non-responsabilité

Mentype® est une marque déposée de BIOTYPE GmbH.

Autres marques : ABI PRISM®, GeneMapper®, SuperScript™, GeneAmp® et Applied Biosystems® (Applied Biosystems LLC group); QIAamp® (Qiagen); POP-4™, POP-1™, POP-7™ (Europe: Applied Biosystems LLC, US: Life Technologies Corporation). La PCR est protégée par des brevets. Les titulaires de brevets sont Hoffmann-La Roche Inc. et F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Les noms déposés, les marques, etc. utilisés dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement marqués comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

Le Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit est un kit de diagnostic marqué CE conformément au règlement européen (UE) 2017/746 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Le produit n'est pas sous licence avec Health Canada et n'est pas autorisé ou approuvé par FDA.

Non disponible dans tous les pays.

© 2025 BIOTYPE GmbH, tous droits réservés.

Explication des symboles



Fabricant



Code du lot



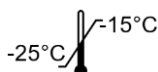
Contient suffisamment de réactifs pour <N> tests



Consulter le mode d'emploi électronique



Date limite d'utilisation



Limite de température



Numéro de catalogue



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Tenir à l'écart de la lumière du soleil



Garder au sec



Unique device identifier

Autres symboles utilisés dans ce mode d'emploi :



Conseils utiles



Attention, veuillez à respecter cette consigne !

texte souligné en bleu

Liens vers des contenus externes tels que des pages d'accueil, des adresses e-mail

texte souligné en noir

Liens croisés dans le document pour faciliter la navigation

texte en italique, cursif, gras

Champs sur lesquels il faut cliquer dans un logiciel

Annexe

Liste des gènes cibles

Gène	Autres noms	ID de transcription
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

Électrophérogrammes des échantillons de référence

Vous trouverez sur les pages suivantes des exemples d'électrophérogrammes de l'Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder ([Figure 2](#)), de l'Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control (PC, [Figure 3](#)) et d'un contrôle sans matrice (NTC, [Figure 4](#)).

Tous les échantillons ont été amplifiés sur un thermocycleur PCR ProFlex et analysés sur un 3500 Genetic Analyzer (POP-4, réseau de 36 cm) à l'aide du paramètre de série validé. L'analyse des données a été effectuée à l'aide de GeneMapper ID-X, version 1.6. Les Bins, Panels et la Analysis method ont été utilisés conformément au [Tableau 11](#).

Les électrophérogrammes sont agrandis à une longueur de fragment comprise entre 50 et 560 pb (axe x). La mise à l'échelle de l'axe y a été effectuée individuellement :

[Figure 2](#), page [59](#): Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder : 3 000 RFU

[Figure 3](#), page [60](#): Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control : 9 000 RFU

[Figure 4](#), page [61](#): Contrôle sans matrice (NTC) : 9 000 RFU

Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder

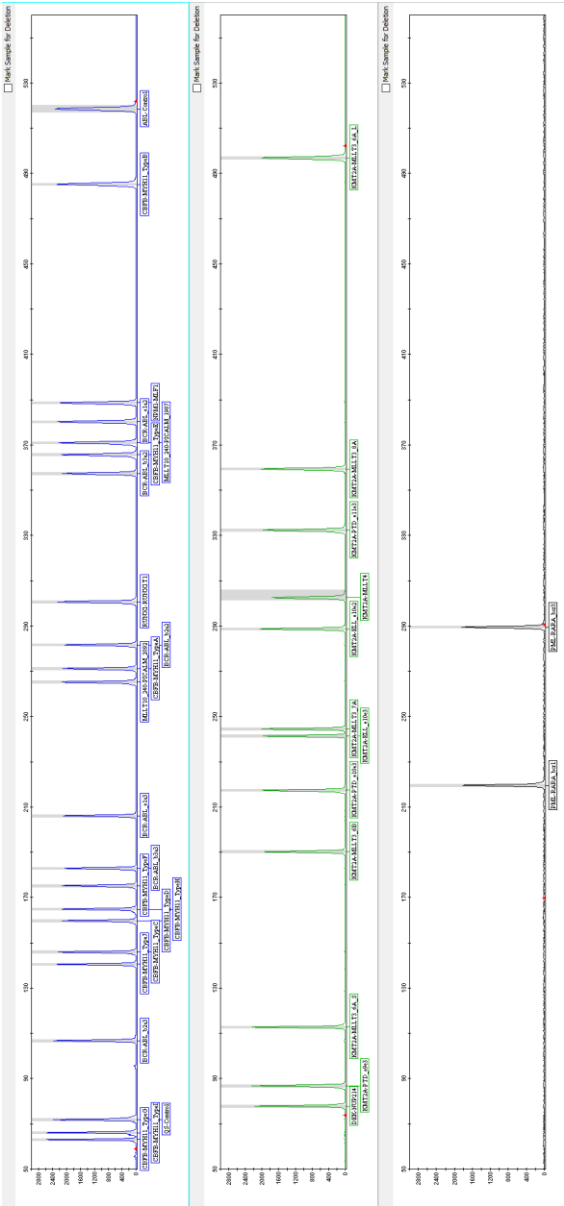


Figure 2 Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder

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

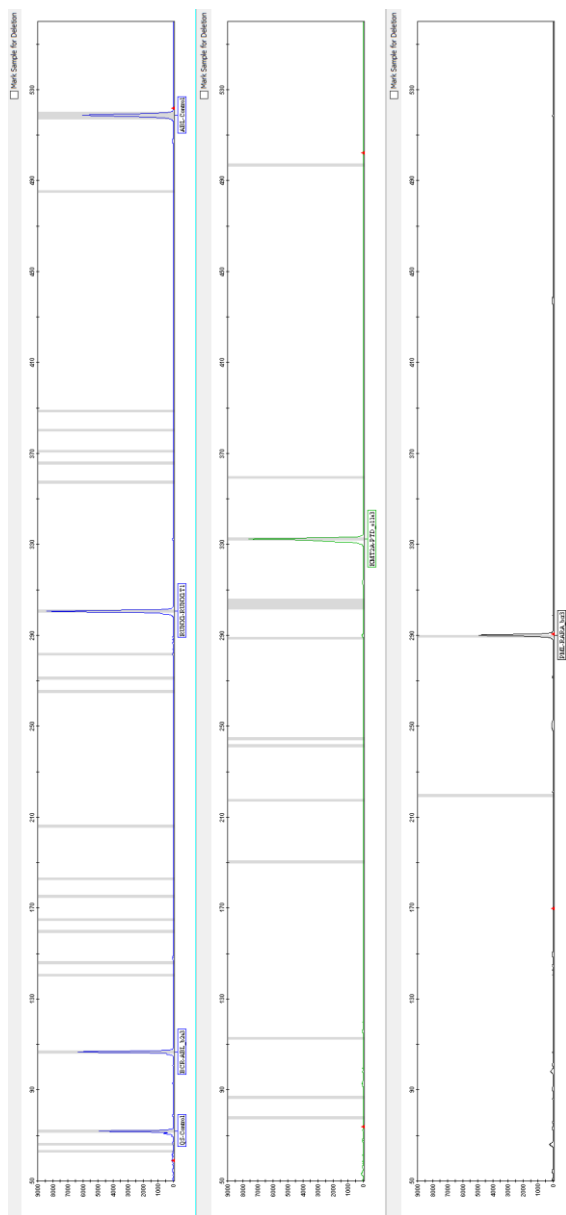


Figure 3 Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control (PC)

No template control (NTC)

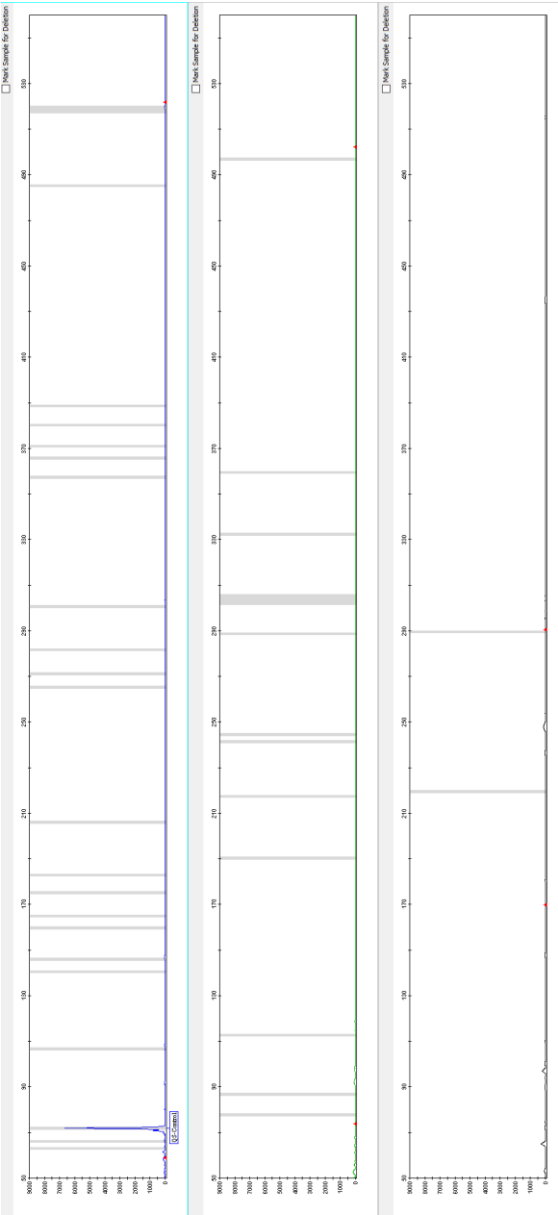


Figure 4 No template control (NTC)

BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 Dresden

Tél. +49 351 8838 400

Fax +49 351 8838 403

www.biotype.de

Commande

sales@biotype.de

Service clients et assistance

support@biotype.de

