

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

PCR Amplification Kit

## Návod k použití (IFU)



0483

Pro diagnostické použití in vitro

AMLIFU02v2cz

23.07.2025



45-12100-0025

45-12100-0100

45-12100-0400



Kód dávky



BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

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

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

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



## Oznámení o změně

Vezměte prosím na vědomí následující úpravy oproti předchozí verzi IFU:

| Kód dokumentu       | Změny                 | Datum      |
|---------------------|-----------------------|------------|
| AMLIFU02v1cz        | Původní verze         | 28.05.2025 |
| <b>AMLIFU02v2cz</b> | Aktualizace tabulky 8 | 23.07.2025 |

Tištěnou verzi tohoto IFU vám můžeme poskytnout zdarma do 7 dnů.

V případě dalších dotazů nás prosím kontaktujte  
na čísle +49 351 8838 400 nebo na [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)

# Obsah

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Zamýšlený účel .....</b>                                                 | <b>4</b>  |
| <b>Vědecké zázemí .....</b>                                                 | <b>4</b>  |
| <b>Popis produktu.....</b>                                                  | <b>5</b>  |
| <b>Poskytnuté materiály.....</b>                                            | <b>7</b>  |
| <b>Popis součástí.....</b>                                                  | <b>8</b>  |
| <b>Skladování činidel a manipulace s nimi .....</b>                         | <b>9</b>  |
| <b>Požadované materiály a zařízení, které nejsou součástí dodávky .....</b> | <b>9</b>  |
| Všeobecné laboratorní vybavení.....                                         | 9         |
| Činidla, soupravy a spotřební materiál.....                                 | 10        |
| Přístroje a software .....                                                  | 11        |
| Vzorky a zkušební vzorky .....                                              | 13        |
| <b>Upozornění a bezpečnostní opatření.....</b>                              | <b>13</b> |
| <b>Upozornění pro uživatele .....</b>                                       | <b>14</b> |
| <b>Postup.....</b>                                                          | <b>15</b> |
| Přehled experimentálního pracovního postupu .....                           | 15        |
| Příprava vzorku .....                                                       | 15        |
| Příprava kontroly .....                                                     | 19        |
| Nastavení master mixu .....                                                 | 19        |
| Amplifikace PCR .....                                                       | 21        |
| <b>Kapilární gelová elektroforéza.....</b>                                  | <b>22</b> |
| Příprava produktů PCR .....                                                 | 22        |
| Analýzadélky fragmentů.....                                                 | 24        |
| <b>Analýza dat .....</b>                                                    | <b>26</b> |
| Obecný postup při analýze dat.....                                          | 26        |
| Analýza vzorku .....                                                        | 29        |
| Analýza dat pomocí GeneMapper™ ID-X.....                                    | 32        |

|                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Řešení problémů.....</b>                                        | <b>35</b> |
| <b>Hodnocení výkonu.....</b>                                       | <b>38</b> |
| <b>Kontrola kvality .....</b>                                      | <b>48</b> |
| <b>Technická pomoc .....</b>                                       | <b>48</b> |
| <b>Odkazy .....</b>                                                | <b>48</b> |
| <b>Omezení použití .....</b>                                       | <b>49</b> |
| <b>Informace pro objednání.....</b>                                | <b>50</b> |
| <b>Ochranné známky a prohlášení o vyloučení odpovědnosti .....</b> | <b>50</b> |
| <b>Vysvětlení symbolů .....</b>                                    | <b>51</b> |
| <b>Příloha .....</b>                                               | <b>53</b> |

## Zamýšlený účel

Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit je manuální test určený ke kvalitativnímu screeningu 11 genových fúzí s celkem 34 transkripčními variantami, který umožňuje identifikaci chromozomálních aberací s diagnostickým, prognostickým a terapeutickým významem u dospělých pacientů trpících akutní myeloidní leukémií (AML) nebo s podezřením na toto onemocnění.

Test se používá s komplementárním DNA (cDNA), který byl reverzně transkribován z buněčného RNA extrahovaného z periferní venózní krve nebo vzorků kostní dřeně.

Souprava Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit se používá k detekci chromozomálních aberací pro klinická rozhodnutí relevantní u akutní myeloidní leukémie. Identifikace specifických genetických translokací umožňuje klasifikaci leukemických onemocnění a poskytuje základní informace pro diagnostické rozhodování o léčbě pacientů s ohledem na riziko.

Souprava Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit je určena pro profesionální laboratorní uživatele vyškolené v molekulárně-genetických technikách, multiplexní PCR a obsluze Genetic Analyzer společnosti Thermo Fisher Scientific (dříve Applied Biosystems).

## Vědecké zázemí

Ověření specifických chromozomálních aberací má vysokou prognostickou hodnotu téměř u všech typů akutní leukémie. Molekulárně biologický důkaz chromozomálních aberací (translokací) představuje důležitý diagnostický doplněk. Detekce specifických translokací umožňuje subtypovou klasifikaci leukemických onemocnění a poskytuje důležité informace pro léčbu pacientů s ohledem na riziko.

Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit usnadňuje detekci nejčastějších chromozomálních aberací pozorovaných dosud v AML a představuje snadno použitelný, rutinní a spolehlivý screeningový nástroj.

## Popis produktu

Souprava Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit obsahuje optimalizovaná činidla pro kvalitativní detekci s vysokým rozlišením 11 fúzních genů s celkem 34 transkripčními variantami (viz [Tabulka 1](#)). Názvy variant se řídí historicky zavedenou nomenklaturou, zejména pro KMT2A (Schnittger et al., 2000). Úplný seznam genů, jejich alternativní názvy a identifikátory transkriptů používané pro systematický popis variant naleznete v příloze (viz [Seznam cílových genů](#)).

Testovací souprava obsahuje interní PCR kontrolu (Quality Sensor “QS-Control”), která je nezávislá na templátu, a kontrolu závislou na templátu cDNA (ABL-Control), která poskytuje užitečné informace o účinnosti PCR, kvalitě použitých cDNA templátů a přítomnosti PCR inhibitorů.

Test se provádí fragmentační analýzou pomocí kapilární gelové elektroforézy. Jeden primer pro každý transkript je fluorescenčně značen 6-FAM, BTG nebo BTY, barevnými spektry příslušenství Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE, GmbH).

**Tabulka 1 Genové fúze a transkripční varianty detekovatelné pomocí soupravy Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit**

| Genová fúze    | Chromozomální aberace  | Varianta               | Systematický popis variant |
|----------------|------------------------|------------------------|----------------------------|
| 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      |
| CBFB::MYH11    | inv(16) (p13.1;q22)    | MLLT10_240-PICALM_2092 | MLLT10:e3::PICALM:e20      |
|                |                        | 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         |
|                |                        | Type G                 | CBFB:e4::MYH11:e29         |

| Genová fúze  | Chromozomální aberace         | Varianta                             | Systematický popis variant                                                           |
|--------------|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|              |                               | Type H<br>Type I<br>Type J           | CBFB:e4::MYH11:e28<br>CBFB:e4::MYH11:e34<br>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;<br>6A_L)<br>7A<br>8A<br>6B | KMT2A:e8::MLLT3:e6<br>KMT2A:e8::MLLT3:e7<br>KMT2A:e8::MLLT3:e8<br>KMT2A:e8::MLLT3:e6 |
| KMT2A::ELL   | t(11;19)<br>(q23.3;p13.1)     | e10e2<br>e10e3                       | KMT2A:e8::ELL:e2<br>KMT2A:e8::ELL:e3                                                 |
| KMT2A-PTD    | Partial Tandem<br>Duplication | e9e3<br>e10e3<br>e11e3               | KMT2A:e8::KMT2A:e2<br>KMT2A:e9::KMT2A:e2<br>KMT2A:e10::KMT2A:e2                      |
| NPM1::MLF1   | t(3;5) (q25.3;q35.1)          | -                                    | NPM1:e6::MLF1:e2                                                                     |
| PML::RARA    | t(15;17)<br>(q24.1;q21.2)     | bcr1<br>bcr2<br>bcr3                 | PML:e6::RARA:e3<br>PML:e5::RARA:e3<br>PML:e3::RARA:e3                                |

Test byl ověřen screeningem genové fúze u přibližně 300 AML pacientů dárce a jejich vhodnost byla potvrzena ve srovnávací klinické vyhodnovací studii.

Detekční limit pro kvalitativní hodnocení je 400 RFU. V průměru lze u každé genové fúze detekovat minimálně 1 000 kopií.

Obecný vstupní rozsah za standardních podmínek do reverzní transkripční reakce je definován jako 100 ng až 1 µg celkového RNA izolovaného z celé krve nebo kostní dřeně.

Optimální vstupní množství pro reverzní transkripci kostní dřeně je definováno jako 500 ng RNA a 1 µg RNA pro periferní krev. Během PCR se pak použije 1 µL cDNA.

## Poskytnuté materiály

**Tabulka 2 Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit**

| Činidlo                                         | Barva kapiláry |  | Objem na velikost balení |            |            |
|-------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------|------------|
|                                                 |                |                                                                                   | 25 reakcí                | 100 reakcí | 400 reakcí |
| Nuclease-Free Water                             | světle modrá   |  | 1,5 mL                   | 2x 1,5 mL  | 6x 1,5 mL  |
| Reaction Mix A                                  | fialová        |  | 125 µL                   | 500 µL     | 2x 1,0 mL  |
| Mentype® AMLplex <sup>QS</sup> Primer Mix       | červená        |  | 63 µL                    | 250 µL     | 4x 250 µL  |
| Multi Taq 2 DNA Polymerase                      | bílá           |  | 10 µL                    | 40 µL      | 160 µL     |
| Mentype® AMLplex <sup>QS</sup> Positive Control | bílá           |  | 25 µL                    | 25 µL      | 25 µL      |
| DNA Size Standard 550 (BTO)                     | oranžová       |  | 13 µL                    | 50 µL      | 200 µL     |
| Mentype® AMLplex <sup>QS</sup> Allelic Ladder   | zelená         |  | 25 µL                    | 25 µL      | 4x 25 µL   |

Přehled čísel šarží součástí naleznete na štítku, který se nachází na vnitřní straně víka krabice.

### POZNÁMKA

Vezměte prosím na vědomí, že velikost balení popisuje počet testů **bez** zohlednění počtu požadovaných kontrol nebo požadovaného přebytku pro pipetování.

**i**

Pro odpovídající propustnost doporučujeme použít následující velikost:

- < 8 vzorků na jeden cyklus PCR: Velikost balení 25 reakcí
- 8–45 vzorků na jeden cyklus PCR: Velikost balení 100 reakcí
- > 45 vzorků na jeden cyklus PCR: Velikost balení 400 reakcí

## Popis součástí

Voda stupně **Nuclease-Free Water (voda bez nukleáz)**: PCR, používaná v PCR soupravě a jako kontrola bez templául (NTC).

**Reaction Mix A (reakční směs A)**: PCR pufr obsahující dNTPs a MgCl<sub>2</sub>. PCR pufr je optimalizován pro podporu enzymatické aktivity při PCR.

**Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Primer Mix (směs primeru)**: multiplexní směs oligonukleotidových primerů obsahující značené primery (značení: 6-FAM™, BTG, BTY) a neznačené primery.

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

**Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control (pozitivní kontrola)**: dvouvláknová směs umělé DNA složená z pěti fragmentů DNA. Používá se jako kvalitativní externí kontrola PCR, která je pozitivní pro následující cíle na všech 3 panelech: BCR::ABL\_b2a3, RUNX1::RUNX1T1, ABL-Control, KMT2A-PTD\_e11e3 a PML::RARA\_bcr3, navíc je amplifikován QS-Control jako marker kvality pro validitu vzorku.

### POZNÁMKA



Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control není pro laboratorní odborníky kritická, protože se skládá z jednotlivých molekul DNA, které byly vyčištěny, nejsou nebezpečné a nemají žádné aktivní biologické funkce. Neobsahuje žádné živé buňky ani patogenní organismy, které by mohly představovat přímé ohrožení.

**DNA Size Standard 550 (BTO) (standardní velikost)**: směs fragmentů PCR značených fluorochromem s definovanou délkou fragmentů mezi 60 a 550 bp, složka se přidává do každého produktu PCR před analýzou délky fragmentů, používá se k regresní analýze velikosti pro přesné stanovení délky fragmentů produktů PCR.

**Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder (žebříček alel)**: směs fluoroforem značených fragmentů PCR, které představují všechny detekovatelné alely soupravy Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit. Obsahuje 22

fragmentů označených 6-FAM™, 12 fragmentů označených BTG a 2 fragmenty označené BTY, které se používají jako genotypová reference pro přesnou identifikaci alel.

## **Skladování činidel a manipulace s nimi**

Souprava je dodávána na suchém ledu. Součásti soupravy by měly být dodány zmrazené, s výjimkou Multi Taq 2 DNA Polymerase, která je skladována v pufru zabraňujícím zmrazení činidla.

Po obdržení zkontrolujte úplnost soupravy. Nepoužívejte soupravy, které byly při dodání rozmrazeny. Pokud jedna nebo více součástí není zmrazená nebo pokud byly trubice nebo obal během přepravy poškozeny, nelze zaručit požadovaný výkon.

Všechny součásti skladujte při teplotě od -25 °C do -15 °C a chraňte před světlem. Zejména Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Primer Mix, DNA Size Standard 550 (BTO) a Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder musí být skladovány chráněné před světlem.

Aby nedošlo ke kontaminaci, doporučujeme, aby součásti před amplifikací (vzorky RNA a cDNA, Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control) a součásti po amplifikaci (DNA Size Standard 550 (BTO) a Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder) byly skladovány a používány odděleně od PCR činidel (Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A and Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Primer Mix).

Doba použitelnosti soupravy vyprší podle údajů na štítku na obalu soupravy nebo 24 měsíců po otevření, podle toho, co nastane dříve. Nepřekračujte maximum 20 cyklů zmrazení a rozmrazení.

## **Požadované materiály a zařízení, které nejsou součástí dodávky**

### **Všeobecné laboratorní vybavení**

- Stolní odstředivka s rotorem pro reakční zkušavky o objemu 2 mL a 200 µL
- Odstředivka s rotorem pro mikrotitrační destičky pro reakční destičky s 96 jamkami

- Vírový mixér
- Kalibrované nastavitelné pipety s likvidačními aerosolovými filtračními hroty
- Vhodné 200 µL reakční destičky s 96 jamkami nebo 200 µL reakční zkumavky s odpovídajícím uzavíracím materiálem, PCR třída
- Vhodné stojany pro reakční zkumavky o objemu 2 mL a 200 µL
- Chladicí stojan vhodný pro zkumavky o objemu 2 mL
- Jednorázové rukavice bez prášku
- NanoDrop™ One Spectrophotometer nebo Qubit™ Fluorometer

## POZNÁMKA



Veškerý materiál použitý pro PCR musí mít odpovídající kvalitu (bez DNA a pro molekulární biologii). Ujistěte se, že všechny použité přístroje byly nainstalovány, kalibrovány, zkontrolovány a udržovány podle pokynů a doporučení výrobce.

## Činidla, soupravy a spotřební materiál

### Tabulka 3 Požadovaná, ale nedodávaná činidla

Upozorňujeme, že některá činidla a spotřební materiál se používají v konkrétních kombinacích a nejsou potřebná pro každý cyklus.

| Činidlo                                                           | Dodavatel                | Objednací číslo       |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| 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<br>4374967    |
| SuperScript™ IV First Strand cDNA Synthesis System                | Thermo Fisher Scientific | 18091050,<br>18091200 |

| Činidlo                                                        | Dodavatel                | Objednáací číslo |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------|
| 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<br>A41331 |
| SeqStudio™ Cathode Buffer                                      | Thermo Fisher Scientific | A33401           |

## Přístroje a software

Kromě ručních metod extrakce pomocí sloupců popsaných v kapitole Příprava vzorku lze pro extrakci RNA použít následující automatizované postupy:

- Zařízení Maxwell® CSC (kat. č.: AS6000, Promega)

Souprava Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit byla ověřena pro použití s následujícími PCR cykly:

- ProFlex PCR System (kat. č.: 4484073 (blok vzorků 3 x 32 jamek), 4484075 (blok vzorků 96 jamek); Thermo Fisher Scientific)
- GeneAmp® PCR System 9700 Silver (přerušené, Thermo Fisher Scientific)
- Mastercycler nexus gradient (kat. č.: 6331000017, Eppendorf AG)
- Mastercycler ep-S (přerušené, , Eppendorf AG)
- Biometra Tadvanced (kat. č.: 846-2-070-211; Analytik Jena)

Použití jiných PCR cykly, než je uvedeno výše, musí být ověřeno uživatelem. Je třeba splnit následující specifikace:

- Vyhřívání víko
- Blok vhodný pro reakční desky / zkumavky o objemu 200 µL
- Ramping nastavitelný na 4 °C/s

Souprava Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit byla ověřena pro použití s následujícím přístrojem a nastavením:

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

Analýza dat byla provedena pomocí softwaru:

- GeneMapper™ ID-X software, verze 1.6 (Thermo Fisher Scientific), při použití specifického produktu:
  - Analysis Method: AMLplexIVD\_Analysis1\_v1x nebo AMLplexIVD\_Analysis4\_v1x nebo AMLplexIVD\_Analysis7\_v1x
  - Bins: AMLplexIVD\_Bins1\_v1x nebo AMLplexIVD\_Bins4\_v1x nebo AMLplexIVD\_Bins7\_v1x
  - Panels: AMLplexIVD\_Panel1\_v1x nebo AMLplexIVD\_Panel4\_v1x nebo AMLplexIVD\_Panel7\_v1x
  - Size Standard: BTO\_60-550\_v1x

Manuální vyhodnocení souborů fsa nebo jakýchkoli výsledků získaných pomocí softwaru pro sběr dat bez softwaru popsaného pro analýzu a vyhodnocení dat není validováno.

#### POZNÁMKA



Ujistěte se, že všechny použité přístroje byly nainstalovány, kalibrovány, zkontrolovány a udržovány podle pokynů a doporučení výrobce.

## Vzorky a zkušební vzorky

Následující vzorky byly ověřeny pomocí soupravy Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit:

- Vzorky lidské periferní venózní krve (EDTA, citrát, heparin a stabilizátor RNA Exact), uchovávané při 4 °C a zpracované pro purifikaci RNA do 24 hodin.
- Vzorky kostní dřeně (EDTA, heparin), uchovávané při 4 °C a zpracované pro purifikaci RNA do 24 hodin.

Získaná RNA se uchovává neředěná při teplotě -85 °C až -70 °C.

### POZNÁMKA



Ujistěte se, že antikoagulant použitý k odběru krve je kompatibilní s pokyny výrobce soupravy pro izolaci RNA.

## Upozornění a bezpečnostní opatření

- Před použitím výrobku si pečlivě přečtěte návod k použití.
- Přečtěte si bezpečnostní listy (SDS) a prohlášení o neškodnosti (NHS) pro všechny produkty BIOTYPE, které jsou k dispozici na vyžádání nebo prostřednictvím ([www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter](http://www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter)). U produktů, které nevyžadují SDS, protože neobsahují SVHC nebo podléhají jiným omezením podle nařízení 1272/2008 (CLP), BIOTYPE poskytuje na vyžádání SDS.
- V případě potřeby dalších činidel, která nejsou součástí dodávky, kontaktujte výrobce materiálů a činidel a vyžádejte si kopie SDS.
- Součásti soupravy z různých šarží soupravy se nesmí míchat.
- Alikvotování součástí soupravy do jiných reakčních nádob není povoleno.
- Použití tohoto produktu je omezeno na profesionální laboratorní uživatele, kteří jsou vyškoleni v molekulárně-genetických technikách, multiplexní PCR a v zacházení s Genetic Analyzers společnosti Thermo Fisher Scientific.
- Před prvním použitím zkontrolujte produkt a jeho součásti z pohledu:
  - celistvosti

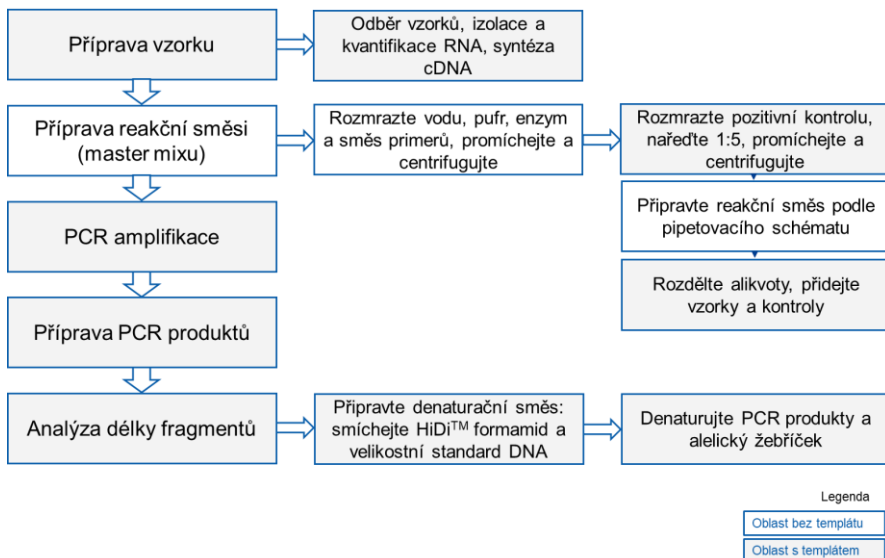
- úplnosti z hlediska počtu, typu a náplně (viz kapitola Poskytnuté materiály)
- správného označení
- dodání v zamrzlém stavu (s výjimkou Multi Taq 2 DNA Polymerase)
- Se vzorky je třeba vždy zacházet jako s infekčními nebo biologicky nebezpečnými materiály v souladu s bezpečnými laboratorními postupy.
- Nepoužívejte soupravu s prošlou dobou použitelnosti.
- Vzorek a odpad z testu zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními a likvidačními předpisy.
- Všechny použité přístroje byly nainstalovány, kalibrovány, zkontrolovány a udržovány podle pokynů a doporučení výrobce.

## Upozornění pro uživatele

Jakýkoli problém, který se vyskytne v souvislosti s produktem, musí uživatel nahlásit výrobci. Jakékoli závažné události související s touto soupravou musí být hlášeny výrobci a příslušnému orgánu členského státu, ve kterém je uživatel nebo pacient registrován. Shrnutí bezpečnosti a funkční způsobilosti (SSP) je vytvořeno v souladu s článkem 29 nařízení (EU) 2017/746 a jeho účelem je zpřístupnit prostřednictvím databáze EUDAMED aktualizované shrnutí údajů o bezpečnosti a funkční způsobilosti zdravotnického prostředku jeho zamýšleným uživatelům, v případě tohoto produktu pouze laboratorním odborníkům.

## Postup

### Přehled experimentálního pracovního postupu



## Příprava vzorku

### Požadavky na surový vzorek

Vzorek pro sadu Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit je definován jako cDNA transkribovaná z RNA extrahované z periferní venózní krve nebo kostní dřeně odebrané z lidského těla.

Doporučujeme použít při odběru vzorků činidla pro stabilizaci RNA. Stabilizátory RNA pomáhají zachovat celistvost RNA (např. S-Monovette RNA Exact). Izolace RNA by měla být provedena ihned po odběru vzorků.

## POZNÁMKA



Dlouhé skladování surového vzorku může vést k fragmentaci genetického materiálu a tím k nedostatečné kvalitě materiálu. To může zhoršit výsledek analýzy, např. kvůli oslabeným signálům nebo neplatným interním kontrolám.

### Krev

Pro následující postup odeberte alespoň 200 µL vzorku periferní venózní plné krve.

Manipulace s periferní venózní plnou krví by se měla řídit doporučením Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline MM05–A2 (2<sup>nd</sup> edition), kde se uvádí, že plnou krev lze skladovat při pokojové teplotě (22 °C až 25 °C) po dobu až 24 hodin nebo při teplotě 2 °C až 6 °C po dobu 72 hodin nebo déle. Dále se doporučuje, aby jako antikoagulant pro odběr celé krve byly použity EDTA, citrát nebo heparin.

### Kostní dřeň

Pro následující postup odeberte alespoň 200 µL vzorku kostní dřeně.

S aspiráty kostní dřeně je třeba zacházet v souladu s doporučením směrnice CLSI guideline MM05–A2 (2<sup>nd</sup> edition), kde se uvádí, že aspiráty kostní dřeně s antikoagulanty (EDTA nebo citrát) by měly být skladovány a přepravovány při teplotě 4 °C. Pro dosažení nejlepších výsledků by RNA měla být extrahována do 1–4 hodin po odběru vzorku.

### Extrakce RNA

Extrakci a purifikaci RNA z periferní plné krve (PB) nebo aspirátu kostní dřeně (BM) proveďte pomocí jedné z následujících souprav:

- Souprava RNeasy® Midi/ Mini/ Plus Mini Kit (Qiagen GmbH) pro antikoagulanty EDTA, citrát a heparin na BM a PB
- NucleoSpin® Dx RNA Blood (Macherey-Nagel) pro stabilizátor RNA Exact na PB

- Souprava Maxwell® CSC RNA Blood Kit (Promega) pro antikoagulanty EDTA a heparin na BM

Při extrakci RNA postupujte podle příruček a doporučení výrobce. Během izolace se doporučuje provést **štěpení DNase** podle pokynů výrobce.

#### POZNÁMKA



Kontaminaci krví lze vizuálně detekovat v PCR reakci nebo v izolované RNA podle oranžového zbarvení. Pokud dojde ke změně barvy, doporučujeme izolaci RNA opakovat, aby se předešlo případným interferencím.

#### POZNÁMKA



Před elucí nukleové kyseliny se ujistěte, že jste odstranili všechny stopy etanolu. Etanol je silným inhibitorem PCR.

### Kvantifikace a ředění RNA

Kvantifikujte koncentraci RNA metodou UV/VIS spektroskopie při 260 nm pomocí NanoDrop™ One spectrophotometer nebo metodou fluorescenční spektroskopie pomocí Qubit™ Fluorometer.

Při použití spektrofotometrie použijte k měření slepého vzorku eluční pufr ze soupravy pro extrakci RNA. Poměr A260/A280 musí být v rozmezí 1,9–2,1, zatímco poměr A260/A230 musí být v rozmezí 1,8–2,3.

Pro fluorometrickou kvantifikaci RNA lze použít Qubit™ Fluorometer s testovací soupravou Qubit™ RNA HS Assay-Kit nebo Qubit™ RNA BR Assay-Kit.

Pro použití s amplifikační soupravou Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit zředte vzorky RNA na koncentraci vhodnou pro následnou transkripci do cDNA. Před použitím připravte čerstvě naředěný vzorek. Jako ředidlo použijte vodu bez nukleázy.

## POZNÁMKA



Rozsah vstupních hodnot pro transkripci do cDNA se řídí pokyny výrobce transkripční soupravy. Použití 100 ng – 1 µg RNA v konečném reakčním objemu 20 µL pro syntézu cDNA je ověřeno pro oba typy vzorků. Doporučujeme použít optimálně **500 ng pro kostní dřev** a **1 µg pro periferní krev**.

## Skladování RNA

Nezředitelné vzorky RNA skladujte ve vodě bez obsahu RNA při teplotě -25 °C až -15 °C po dobu maximálně 24 hodin nebo při teplotě -85 °C až -70 °C po dobu maximálně jednoho roku.

## Transkripce do cDNA

Syntézu cDNA proveďte podle pokynů výrobce s použitím jedné z následujících sad:

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

\*doporučuje se pro nízké množství RNA

## POZNÁMKA



**Tepelná inaktivace** reverzní transkriptázy je rozhodující pro správnou účinnost PCR. Podrobnosti viz pokyny výrobce.

## Skladování cDNA

Vzorky cDNA skladujte při teplotě -25 °C až -15 °C po dobu maximálně jednoho roku.

## Příprava kontroly

### Pozitivní kontrola PC

Rozmrazte Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control, homogenizujte ji opatrným vířením a následnou krátkou centrifugací.

Zředte Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control v poměru 1:5 pomocí Nuclease-Free Water obsažené v soupravě. Např. smíchejte 1 µL kontrolního vzorku se 4 µL Nuclease-Free Water.

Zředěný PC homogenizujte opatrným vířením. Poté naředěný PC krátce odstředte (po dobu přibližně 5 s).

Zředěnou pozitivní kontrolu neskladujte.

#### POZNÁMKA



Vždy použijte čerstvě naředěný vzorek Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control.

### Kontrola NTC bez templátu

Jako kontrolu bez templátu NTC použijte vodu bez nukleázy, která je součástí soupravy, namísto vzorku.

### Nastavení master mixu

Ze soupravy Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit vyjměte a rozmrazte následující součásti:

- Nuclease-Free Water (světle modré víčko)
- Reaction Mix A (fialové víčko)
- Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Primer Mix (červené víčko)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (bílé víčko)

Všechny zmrazené součásti je třeba rozmrazit při pokojové teplotě (22 °C až 25 °C, cca 30 min, chráněno před světlem) a homogenizovat převrácením zkumavek, pipetováním nebo jemným vířením. Poté krátce odstředte (po dobu přibližně 5 s). Před přípravou master mixu se doporučuje uchovávat

Multi Taq 2 DNA Polymerase co nejdéle v chladu (např. v roštích na chlazení).

**POZNÁMKA**

Pro delší stabilitu promíchejte Multi Taq 2 DNA Polymerase krátkým pohybem – **neviřte enzym.**

Ve vyhrazeném čistém prostoru připravte PCR master mix podle Tabulka 4 do mikrocentrifugační zkumavky vhodné velikosti pro celkový počet testovaných vzorků. Do výpočtu zahrňte alespoň jeden PC a jeden NTC.

**POZNÁMKA**

Zpravidla platí, že pokud testujete méně než 10 vzorků, použijte dostatečné množství master mixu pro jeden vzorek navíc. Pokud testujete 10 nebo více vzorků, použijte o 10 % větší objem směsi činidla.

**Tabulka 4 Nastavení reakce s master mix PCR**

| Součást                                   | Objem          |                 |                 |
|-------------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
|                                           | 1              | 5               | 10              |
| Nuclease-Free Water*                      | 16,1 µL        | 80,5 µL         | 161,0 µL        |
| Reaction Mix A                            | 5,0 µL         | 25,0 µL         | 50,0 µL         |
| Mentype® AMLplex <sup>QS</sup> Primer Mix | 2,5 µL         | 12,5 µL         | 25,0 µL         |
| Multi Taq 2 DNA Polymerase                | 0,4 µL         | 2,0 µL          | 4,0 µL          |
| Templát cDNA nebo kontrolní vzorek*       | 1,0 µL         | 5x 1,0 µL       | 10x 1,0 µL      |
| <b>Celkový objem</b>                      | <b>25,0 µL</b> | <b>125,0 µL</b> | <b>250,0 µL</b> |

\*Vstupní množství templátu lze zvýšit na 2 µL, v takovém případě je nutné upravit objem vody bez nukleáz.

Smíchejte master mix jemným protřepáním a poté krátce odstředte.

Alikvotujte 24,0 µL PCR master mixu do připravených PCR zkumavek o objemu 200 µL a uzavřené zkumavky krátce odstředte.

### Použití cDNA templátů a kontrol

Do připravených PCR zkumavek obsahujících PCR master mix přidejte 1,0 µL následujících typů vzorků.

**NTC:** namísto vzorku přidejte 1,0 µL Nuclease-Free Water.

**Templát cDNA:** přidejte 1,0 µL neředěných vzorků cDNA.

**PC:** namísto vzorku přidejte 1,0 µL čerstvě připraveného roztoku Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Contro zředěného v poměru 1:5.

#### POZNÁMKA



Nejprve připravte NTC, aby nedošlo ke kontaminaci kontrolního vzorku. PC připravte jako poslední, aby nedošlo ke křížové kontaminaci vzorků.

#### POZNÁMKA



Použijte alespoň jednu pozitivní kontrolu PC a jednu kontrolu bez templátu NTC na jeden cyklus. V opačném případě nelze cyklus validovat.

Všechny zkumavky PCR uzavřete, jemně promíchejte a odstředíte.

### Amplifikace PCR

Naprogramujte PCR cykler podle následujícího amplifikačního profilu a ujistěte se, že jste nastavili rychlost ohřevu na 4 °C/s. Provedte „horký start“ PCR, aby se aktivovala polymeráza a zabránilo se tvorbě nespecifických amplifikačních produktů.

#### POZNÁMKA



Použití kalibrovaných a dobře udržovaných PCR cyklerů je nezbytné, protože odchylky mohou negativně ovlivnit amplifikaci citlivých cílů, jako je KMT2A::MLLT4.

**Tabulka 5 Protokol PCR**

| Teplota | Čas                                            |
|---------|------------------------------------------------|
| 96 °C   | 4 minuty (horký start pro aktivaci polymerázy) |
| 96 °C   | 30 s                                           |
| 60 °C   | 120 s      25 cyklů                            |
| 72 °C   | 75 s                                           |
| 68 °C   | 10 min*                                        |
| 10 °C   | ∞      udržování                               |

\* Pokud je pozorováno vyšší množství minus -adeninů píků (-1 bp), je možné prodloužení až na 60 minut.

**POZNÁMKA**

Pokud se používají termocyklery s nastavitelnou rychlostí ohřevu a ochlazování, **je třeba nastavit rychlost změny teploty na 4 °C/s**, aby byla zajištěna optimální rovnováha soupravy.

**POZNÁMKA**

Základní informace o nastavení, programování a údržbě různých PCR přístrojů naleznete v uživatelské příručce příslušného přístroje.

**Kapilární gelová elektroforéza****Příprava produktů PCR**

Po dokončení PCR vyjměte vzorky z cykleru a krátce je odstředěte.

**POZNÁMKA**

Po dokončení PCR lze produkty PCR skladovat po dobu 4 týdnů při teplotě 2 °C až 8 °C nebo dlouhodobě při teplotě -25 °C až -15 °C chráněné před světlem.

Rozmrázte, smíchejte a odstředte činidla:

- Hi-Di™ Formamide (není součástí soupravy)
- Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder (zelené víčko)
- DNA Size Standard BTO (550) (oranžové víčko)

Připravte denaturační směs popsanou v Tabulka 6 a přidejte jednu nebo dvě reakce pro kompenzaci odchylek při pipetování. Přidejte jednu reakci navíc pro žebříček alel.

**Tabulka 6 Denaturační směs**

| Součást                     | Objem na reakci |
|-----------------------------|-----------------|
| Hi-Di™ Formamide            | 12,0 µL         |
| DNA Size Standard BTO (550) | 0,5 µL          |

Napipetujte 12,0 µL denaturační směsi do jamek destičky PCR (vhodné pro použití s Genetic Analyzer).

Do jamek přidejte buď 1,0 µL produktu PCR, nebo 1,0 µL Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder. Destičku PCR uzavřete vhodnou fólií, zavřete a krátce odstředte.

#### POZNÁMKA



Žebříček alel se používá k správnému určení fragmentů analyzovaných během analýzy dat. Při každém spuštění analýzy délky fragmentů musí být žebříček alel analyzován alespoň jednou, aby byla zajištěna úspěšná analýza dat.

#### POZNÁMKA



Kapiláry gelového elektroforetického zařízení nesmí nikdy vyschnout. Pokud vzorky nezabírají všechny kapilární pozice, naplňte další jamky destičky 12,0 µL Hi-Di™ Formamide podle počtu kapilár.

Připravené produkty PCR denaturujte v PCR cyklu po dobu 3 minut při teplotě 95 °C a poté vzorky v cyklu ochlaďte na 4 °C. Před analýzou délky fragmentů vzorky krátce odstředěte.

## Analýza délky fragmentů

Před provedením první analýzy délky fragmentů spusťte **Matrix Standard BT5 multi** (BIOTYPE GmbH), aby se provedlo spektrální zarovnání použitých fluorescenčních barviv pro Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit (6-FAM™, BTG, BTY, BTO).

### POZNÁMKA



Informace o instalaci naleznete v návodu k použití Matrix Standard BT5 multi. en je k dispozici na webových stránkách [www.biotype.de/en/ifus](http://www.biotype.de/en/ifus) nebo na vyžádání na adrese [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de) od společnosti BIOTYPE GmbH.

Po úspěšném spuštění Matrix Standard BT5 multi importujte nastavení přístroje pro 3500 Genetic Analyzer podle popisu v Tabulka 7 ([www.biotype.de/en/template-files](http://www.biotype.de/en/template-files)).

**Tabulka 7 Poskytnuté soubory pro Genetic Analyzers**  
([www.biotype.de/en/template-files](http://www.biotype.de/en/template-files))

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

Specifikace požadovaného protokolu přístroje jsou popsány v Tabulka 8. Upravovat by se měly pouze popsané parametry, ostatní parametry by měly zůstat ve výchozím nastavení. Při nastavování konkrétních provozních parametrů postupujte podle pokynů návodu k použití od výrobce.

**Tabulka 8 Parametry pro provozní moduly různých zařízení pro kapilární gelová elektroforetická zařízení**

|                              | Injection Voltage [kV] | Injection Time [s] | Run Voltage [kV]                                                       | Run Time [s] |
|------------------------------|------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3500 Series Genetic Analyzer | 3,0                    | 8                  | 36 cm Capillary Array: <b>15</b><br>50 cm Capillary Array: <b>19.5</b> | 1 560        |
| SeqStudio™ Genetic Analyzer  | 1,2                    | 10                 | 9                                                                      | 1 560        |

Na rozdíl od hodnot uvedených v Tabulka 8 lze dobu provozu upravit tak, aby byly analyzovány všechny fragmenty (60–550 bp) DNA Size Standard 550 (BTO).

Pro nastavení Size Standard protocol je třeba oranžovému panelu přiřadit následující velikosti DNA Size Standard 550 (BTO):

**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, a 550 bp.**

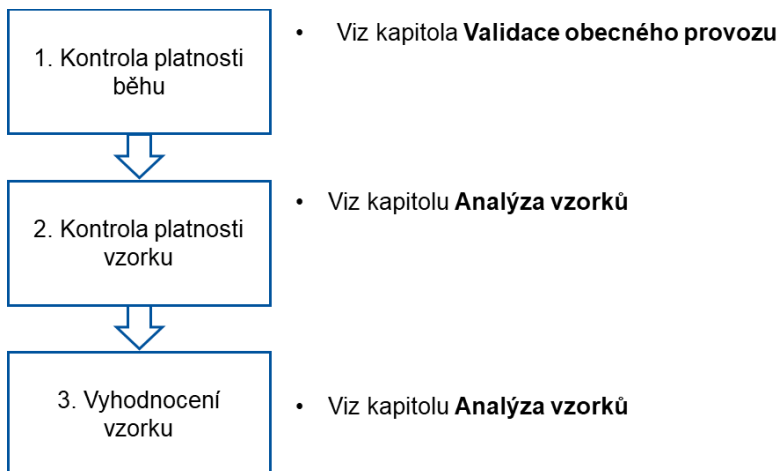
#### POZNÁMKA



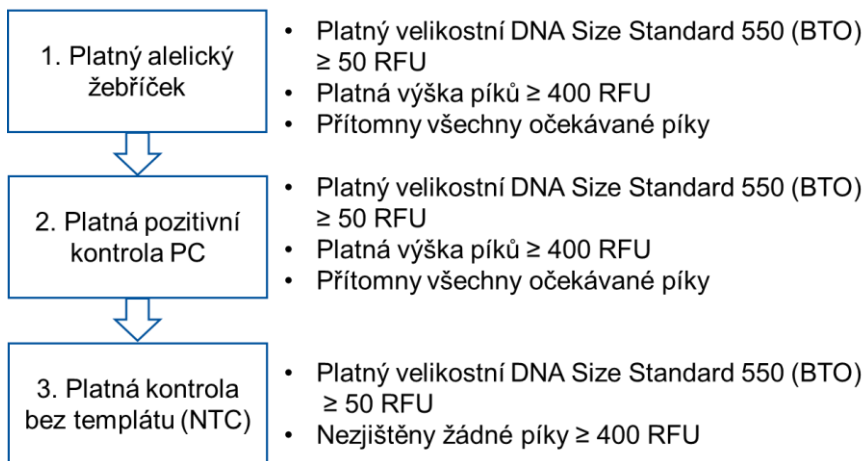
Společnost BIOTYPE GmbH poskytuje specifické templáty pro snadnou instalaci konkrétních provozních nastavení pro analýzu délky fragmentů, jakož i analytické templáty pro jednoduché nastavení GeneMapper™ ID-X. Tyto templáty jsou k dispozici ke stažení na adrese: [www.biotype.de/en/template-files](http://www.biotype.de/en/template-files).

## Analýza dat

### Obecný postup při analýze dat



### Validace obecného provozu



**POZNÁMKA**

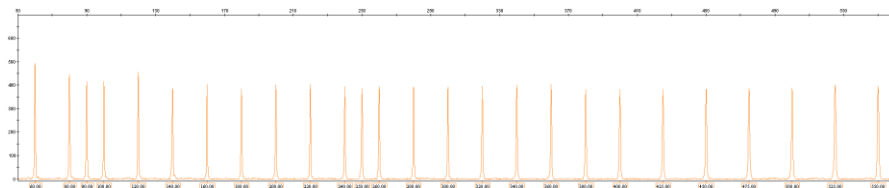
Pro posouzení validity je třeba analyzovat celý rozsah měření od 50 bp do 560 bp.

**DNA Size Standard 550 (BTO)**

Zjištění přesné délky amplifikovaných produktů závisí na typu zařízení, podmínkách elektroforézy a také na použitém standardu velikosti DNA. Vzhledem ke složitosti některých cílů by stanovení velikosti mělo být založeno na rovnoměrně rozložených referencích.

U všech vzorků zkontrolujte DNA Size Standard 550 (BTO) podle následujících kritérií:

- Přítomnost všech fragmentů na: **60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525, a 550 bp** (viz [Obrázek 1](#))
- Všechny fragmenty jsou přítomny s  $\geq 50$  RFU
- Koeficient determinace je  $R^2 > 0,995$   
(viz Size Match Editor z GeneMapper ID-X)
- Fragmenty se s rostoucí délkou fragmentu nepřetržitě nesnižují ve výšce vrcholu.



**Obrázek 1** Electropherogram DNA Size Standard 550 (BTO), fragmenty s délkou v bp

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

Po ověření platné normy velikosti zkontrolujte, zda jsou všechny píky v žebříčku alel přítomny s  $\geq 400$  RFU.

**POZNÁMKA**

Žebříček Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder obsahuje jeden pík pro každý detekovatelný cíl. Porovnejte prosím alely s přílohou Obrázek 2.

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

Po ověření platné normy velikosti se ujistěte, že jsou přítomny všechny specifické píky pro PC s  $\geq 400$  RFU.

Pozitivní kontrola Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control, která je součástí testovací soupravy, představuje následující cíle (viz Tabulka 9).

**Tabulka 9 Kontrolní píky v pozitivní kontrole Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control**

| Panel  | Kontrolní pík                                                                                                                            |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Modrý  | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ QS-Control</li> <li>▪ BCR::ABL_b2a3</li> <li>▪ RUNX1::RUNX1T1</li> <li>▪ ABL-Control</li> </ul> |
| Zelený | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ KMT2A-PTD_e11e3</li> </ul>                                                                      |
| Žlutý  | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ PML::RARA_bcr3</li> </ul>                                                                       |

**POZNÁMKA**

Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control obsahuje alespoň jeden pík pro každý použitý panel. Porovnejte prosím alely s přílohou Obrázek 3.

**No template control NTC**

Po ověření platné normy velikosti zkontrolujte, zda v NTC nejsou detekovány žádné píky  $\geq 400$  RFU (viz také příloha Obrázek 4).

**POZNÁMKA**

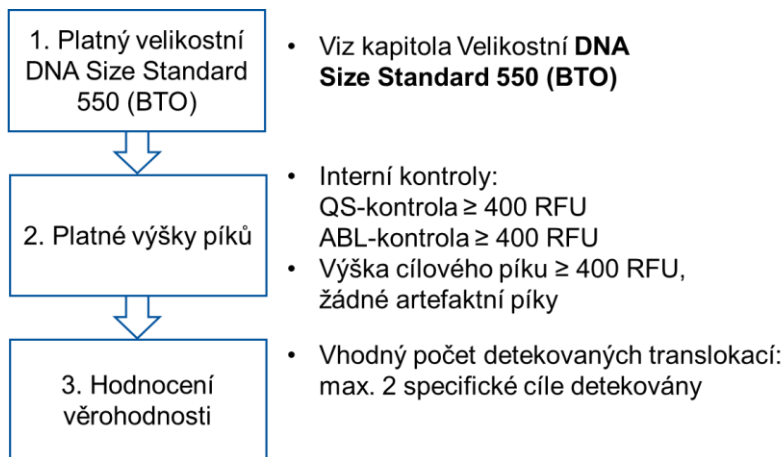
Při použití GeneMapper ID-X společně s dodanými templátovými soubory pro metodu analýzy nejsou vrcholy < 400 RFU ve vzorcích soupravy Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit automaticky přiřazeny k názvu alely, což vám usnadní vyhodnocení NTC.

**POZNÁMKA**

Artefakty, jako jsou malé skvrny barviva, se mohou vyskytovat výrazněji v rámci NTC. Díky široké základně píku, abnormálnímu tvaru píku a absenci přiřazení píku je možné odlišit je od píků ampliconů.

## Analýza vzorku

### Analýza dat pracovního toku



**POZNÁMKA**

Pokud počet detekovaných cílů překročí mezní hodnotu nebo pokud narazíte na jakékoli nejasnosti, podívejte se do části věnované řešení problémů (např. seznam známých kombinací signálů) nebo se obraťte na zákaznickou podporu na adrese [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de).

Pomocí GeneMapper™ ID-X software a specifických šablon poskytnutých společností BIOTYPE GmbH se základní validace provádí automaticky.

Po kontrole správnosti provedení a platnosti vzorků je nutné vyhodnotit data vzorků.

**POZNÁMKA**

Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> je **výhradně kvalitativní test**. Tato aplikace není vhodná pro kvantifikaci počtu kopií, jako je monitorování minimálního reziduálního onemocnění (MRD).

Při použití evaluačních templátů společnosti BIOTYPE GmbH a úspěšné evaluaci žebříčku alel provedeného testu jsou detekované fragmenty PCR automaticky pojmenovány. Přehled délek fragmentů produktů PCR je uveden v následující Tabulka 10.

**Tabulka 10 Přehled délek fragmentů translokací v žebříčku Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder** na polymeru POP-4™. ‡ Dva amplikony pro variantu KMT2A::MLLT3\_6A; \*Ačkoli je tato varianta detekovatelná pomocí amplifikační soupravy Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit, různá délka ampliconu (přibližně 173 bp) brání automatickému přiřazení

| Panel/ translokace      | Délka [bp] | Panel / translokace             | Délka [bp] |
|-------------------------|------------|---------------------------------|------------|
| FAM Panel (modrý kanál) |            | <b>BTG Panel (zelený kanál)</b> |            |
| CBFB::MYH11_TypeG       | 63         | DEK::NUP214                     | 78         |
| CBFB::MYH11_TypeI       | 66         | KMT2A-PTD_e9e3                  | 87         |

| Panel/ translokace      | Délka [bp] | Panel / translokace              | Délka [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        | <b>BTY Panel ( žlutý kanál )</b> |            |
| BCR::ABL_b2a2           | 282        | PML::RARA_bcr1                   | 220        |
| RUNX1::RUNX1T1          | 301        | PML::RARA_bcr3                   | 290        |
| BCR::ABL_b3a2           | 357        | PML::RARA_bcr2*                  |            |
| CBFB::MYH11_TypeE       | 366        |                                  |            |
| MLLT10_240::PICALM_1987 | 371        |                                  |            |
| BCR::ABL_e1a2           | 380        |                                  |            |
| NPM1::MLF1              | 389        |                                  |            |
| CBFB::MYH11_TypeB       | 485        |                                  |            |
| ABL-Control             | 519        |                                  |            |

## Analýza dat pomocí GeneMapper™ ID-X

### Příprava GeneMapper™ ID-X software

Obecné pokyny k použití a analýze vzorků pomocí tohoto softwaru naleznete v uživatelské příručce k softwaru GeneMapper™ ID-X Software.

Přidělení alel se provádí pomocí analytického softwaru GeneMapper™ ID-X v kombinaci s templátovými soubory soupravy Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit od společnosti BIOTYPE GmbH. Templátové soubory BIOTYPE (viz [Tabulka 11](#)) jsou k dispozici na naší domovské stránce ([www.biotype.de/en/template-files](http://www.biotype.de/en/template-files)) ke stažení nebo na vyžádání na adrese [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de). Pracovní postup analýzy pomocí softwaru GeneMapper™ ID-X software je uveden v [Tabulka 12](#).

**Tabulka 11 Templáty BIOTYPE GmbH pro GeneMapper™ ID-X Software,**  
šablony specifické pro <sup>1</sup>POP-1™, <sup>2</sup>POP-4™ a <sup>3</sup>POP-7™ polymer

| Templát          | Název templátu                                                                                                          |                  |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Panels*          | AMLplexIVD_Panel1_v1x <sup>1</sup><br>AMLplexIVD_Panel4_v1x <sup>2</sup><br>AMLplexIVD_Panel7_v1x <sup>3</sup>          | nebo vyšší verze |
| BinSets*         | AMLplexIVD_Bins1_v1x <sup>1</sup><br>AMLplexIVD_Bins4_v1x <sup>2</sup><br>AMLplexIVD_Bins7_v1x <sup>3</sup>             | nebo vyšší verze |
| Size Standard*   | BTO_60-550_v1x                                                                                                          | nebo vyšší verze |
| Analysis Method* | AMLplexIVD_Analysis1_v1x <sup>1</sup><br>AMLplexIVD_Analysis4_v1x <sup>2</sup><br>AMLplexIVD_Analysis7_v1x <sup>3</sup> | nebo vyšší verze |
| Plot Settings    | PlotsBT5_4dyes                                                                                                          |                  |
| Table Settings   | Table for 2 Alleles                                                                                                     |                  |
|                  | Table for 10 Alleles                                                                                                    |                  |

\*Tyto templáty musí být vždy použity pro analýzu dat. Ostatní templátové soubory jsou volitelné.

## POZNÁMKA



Import a určování alel pomocí dodaných templátových souborů je zaručeno pouze při použití softwaru GeneMapper™ ID-X software. Při použití softwaru GeneMapper™ software mohou u některých templátových souborů nastat problémy s importem. Možná bude nutné upravit Panels a Bins pomocí jedné nebo více analýz žebříčku alel na konkrétním nastavení přístroje. V případě potíží nás kontaktujte ([support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)).

**Tabulka 12 Pracovní postup analýzy dat pomocí GeneMapper™ ID-X**

| Č.              | Ikona                                                                | Pracovní krok                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |               |       |             |                                                                   |                 |                                                                      |       |                                                                    |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-------|-------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------|-------|--------------------------------------------------------------------|
| 1               |                                                                      | Příprava softwaru                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |               |       |             |                                                                   |                 |                                                                      |       |                                                                    |
|                 |                                                                      | <b>Panel Manager</b><br>Import dodaných templátových souborů pro Panels a Bins                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |               |       |             |                                                                   |                 |                                                                      |       |                                                                    |
|                 |                                                                      | <b>GeneMapper™ ID-X Manager</b><br>Import dodaných templátových souborů pro Analysis Method a Size Standard                                                                                                                                                                                                                                                                           |               |       |             |                                                                   |                 |                                                                      |       |                                                                    |
| 2               |                                                                      | Import vzorku                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |               |       |             |                                                                   |                 |                                                                      |       |                                                                    |
|                 |                                                                      | <b>Add Samples to Project</b><br>- vyhledejte složku pro spuštění, vyberte a klikněte na <b>Add to List → Add</b>                                                                                                                                                                                                                                                                     |               |       |             |                                                                   |                 |                                                                      |       |                                                                    |
| 3               |                                                                      | Analýza vzorku                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |               |       |             |                                                                   |                 |                                                                      |       |                                                                    |
|                 |                                                                      | V příslušných sloupcích listu vzorku vyberte následující vlastnosti a vyberte <b>Analyze</b> .                                                                                                                                                                                                                                                                                        |               |       |             |                                                                   |                 |                                                                      |       |                                                                    |
|                 |                                                                      | <table><tr><th>Název sloupce</th><th>Výběr</th></tr><tr><td>Sample Type</td><td>žebříček alel, pozitivní kontrola, negativní kontrola nebo vzorek</td></tr><tr><td>Analysis Method</td><td>Vyberte dříve importovaný BIOTYPE templát<br/>AMLplexIVD_Analysis_v1x</td></tr><tr><td>Panel</td><td>Vyberte dříve importovaný BIOTYPE template<br/>AMLplexIVD_Panel_v1x</td></tr></table> | Název sloupce | Výběr | Sample Type | žebříček alel, pozitivní kontrola, negativní kontrola nebo vzorek | Analysis Method | Vyberte dříve importovaný BIOTYPE templát<br>AMLplexIVD_Analysis_v1x | Panel | Vyberte dříve importovaný BIOTYPE template<br>AMLplexIVD_Panel_v1x |
| Název sloupce   | Výběr                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |               |       |             |                                                                   |                 |                                                                      |       |                                                                    |
| Sample Type     | žebříček alel, pozitivní kontrola, negativní kontrola nebo vzorek    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |               |       |             |                                                                   |                 |                                                                      |       |                                                                    |
| Analysis Method | Vyberte dříve importovaný BIOTYPE templát<br>AMLplexIVD_Analysis_v1x |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |               |       |             |                                                                   |                 |                                                                      |       |                                                                    |
| Panel           | Vyberte dříve importovaný BIOTYPE template<br>AMLplexIVD_Panel_v1x   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |               |       |             |                                                                   |                 |                                                                      |       |                                                                    |

| Č. | Ikona                                                                             | Pracovní krok                                                                                                                                                                       |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                                                                   | <div>Size Standard</div> <div>Vyberte dřívě importovaný BIOTYPE template BTO_60-550_v1x</div>                                                                                       |
| 4  |                                                                                   | Ověřovací kontroly                                                                                                                                                                  |
|    |  | <p>Kontrola platnosti ověření (žebříček alel, pozitivní kontrola, negativní kontrola)</p> <p>Při dostatečné výšce píku se přiřazení provádí podle specifikací v Analysis Method</p> |
| 5  |                                                                                   | Hodnocení vzorku                                                                                                                                                                    |
|    |  | <p>Kontrola platnosti vzorku.</p> <p>Při dostatečné výšce píku se přiřazení provádí podle specifikací v Analysis Method</p>                                                         |

**POZNÁMKA****i**

Pomocí dodaných templátových souborů pro Analysis Method, Bins, Panels a výběrem odpovídajícího typu vzorku software automaticky zkontroluje platnost těchto vzorků. Kontrolní značky kvality SOS (Sample off-Scale), SQ (Sizing Quality), OMR (Outside Marker Range) musí být zelené, aby byla validita schválena.

| ARNM                                                                                | SOS                                                                                 | SQ                                                                                  | SSPK                                                                                | MIX                                                                                 | OMR                                                                                 | CGQ                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |  |  |  |  |  |

**POZNÁMKA****i**

K vyhodnocení velikostní normy použijte Size Match Editor v GeneMapper™ ID-X. Pokud automatické určování fragmentů selhalo, lze pro orientaci při ručním přiřazování píků použít trojice 80 / 90 / 100 bp a 240 / 250 / 260 bp.

## Řešení problémů

Pro přesnou a spolehlivou detekci cílů je třeba provést post PCR analýzu, včetně automatického přiřazení a validace cílů, pomocí validovaného GeneMapper ID-X software v kombinaci s templátovými soubory BIOTYPE. V případě jakýchkoli nejasností se obraťte na [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de).

### Pull up píky

K pull up píkům může dojít, pokud jsou výšky píků mimo lineární detekční rozsah nebo pokud byla použita nesprávná matice. Objevují se na pozicích specifických píků v jiných barevných kanálech, obvykle s nižší intenzitou signálu. Tento efekt je třeba zohlednit v případě vysokých amplifikačních profilů následujících cílů:

- PML::RARA\_bcr3 (žlutý kanál) způsobuje pull up pík v KMT2A::ELL\_e10e2 (zelený kanál)
- RUNX1::RUNX1T1 (modrý kanál) způsobuje pull up pík v KMT2A::MLLT4 (zelený kanál, pouze když byl použit POP-7<sup>TM</sup> Polymer)

### Přidávání nukleotidů nezávisle na templátu

Vzhledem ke své terminální transferázové aktivitě má Multi Taq 2 DNA Polymerase tendenci přidávat adenosinový radikál na 3'-konec amplifikovaných fragmentů DNA. Artefaktový pík je o jednu bázi kratší, než se očekává (-1 bp píky). Všechny primery BIOTYPE jsou navrženy tak, aby tyto artefakty minimalizovaly. Tvorba artefaktů se dále snižuje volitelným prodloužením konečného kroku PCR protokolu na 68 °C po dobu 60 minut. Výška píku artefaktu koreluje s množstvím cDNA. Laboratoře by měly stanovit své individuální limity pro analýzu píků.

### Artefakty

Pokožová teplota může ovlivnit účinnost produktů PCR na přístrojích s více kapilárami a může dojít k výskytu postranních píků nebo rozštěpených píků. V některých případech může být ovlivněno také automatické přiřazování. Pokud se tyto jevy vyskytnou, doporučujeme vzorek injekčně aplikovat znovu při vyšší pokojové teplotě. Vždy zvažte použití nových spotřebních materiálů podle doporučení výrobce.

## **Vliv polymerů**

Souprava Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit byla validována a certifikována pro analýzu na POP-4<sup>TM</sup> polymer. Použití jiných polymerů (jako POP-7<sup>TM</sup> nebo POP-1<sup>TM</sup>) bylo verifikováno, ale může ovlivnit chování konkrétních produktů PCR. Kromě toho se může zvýšit šum pozadí v důsledku odlišného chování volných fluorescenčních barviv.

## **Odchytky při pipetování**

Analýza robustnosti Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit ukázala, že souprava je robustní vůči menším odchylkám od popsaného protokolu (+/- 10 %). Pro analýzu může být kritičtější střední odchylka (+/- 20 %) od popsaného experimentálního protokolu. Je nutné věnovat pozornost středním odchylkám -20 % v součástech PCR, protože výrazně snižují výšku signálu. Nejcitlivějšími cíli v tomto kontextu jsou KMT2A::MLLT4 a DEK::NUP214.

Pro minimalizaci případných odchylek doporučujeme používat kalibrované pipety, přesné pipetování a důkladné míchání.

## **Nízké kontrolní píky ABL**

Interní kontrola ABL tvoří nejdelší ampikon soupravy Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit, a je proto nezbytným markerem kontroly kvality. V případě nízké výšky píku ABL-control je nejpravděpodobnější jedna z následujících příčin:

Příliš nízký vstup templátu do reakce: určete koncentraci RNA a podle potřeby zvýšte vstup cDNA syntézy.

Fragmentovaná RNA, tj. menší ampikony z cílů, mohou být pozitivní, ale chybí vnitřní kontrola ABL. Zkontrolujte postup přípravy vzorků z hlediska kontaminace RNA. Je známo, že v archivovaných vzorcích dochází k fragmentaci RNA.

Neúčinná syntéza cDNA: při syntéze cDNA dodržujte pokyny výrobce. Použijte jednu z ověřených souprav pro syntézu cDNA, jak je popsáno v kapitole Transkripce do cDNA.

Vzorek je kontaminován aktivním enzymem reverzní transkriptázy: dodržujte pokyny výrobce, zejména pokyny týkající se tepelné inaktivace během syntézy cDNA.

## Další amplikony nebo dvojité pozitivita

U většiny vzorků pacientů se očekává negativní výsledek nebo pozitivní výsledek pro jednu translokaci. Více než jedna translokace je neobvyklý výsledek a může vyžadovat další ověření. Nicméně u vzorků pacientů byly již dříve pozorovány některé kombinace, například následující:

Cíl BCR::ABL\_b2a3 se může objevit s relativně nízkou výškou píku, pokud dochází k silné amplifikaci pro ABL-control nebo jakoukoli jinou transkripční variantu BCR::ABL (asi 5–10 % výsledku hlavního cíle).

Je známo, že KMT2A partial tandem domain (KMT2A-PTD) se vyskytuje současně s jinými translokacemi a v komplexních přestavbách, které mohou být pozitivní pro více než jednu variantu KMT2A-PTD.

Při použití POP7<sup>TM</sup>-Polymer může translokace CBFB::MYH11\_Type A vést k nespecifickému signálu pro RUNX1::RUNX1T1 a CBFB::MYH11\_Type F. Pík RUNX1::RUNX1T1 je při použití POP4 polymeru přiřazen jako mimo žebříček a lze jej ověřit pomocí buněčné linie ME-1. Oba nespecifické vedlejší píky vykazují nižší výšku píku RFU ve srovnání s CBFB::MYH11\_Type A. Při použití POP7<sup>TM</sup>-Polymer může být nespecifický pík mimo žebříček přiřazen jako translokace CBFB::MYH11\_Type I s výškou píku pod 2 000 RFU.

Cíl KMT2A::MLLT4 se vyskytuje se dvěma různými délkami amplikonů v závislosti na prevalenci variant transkriptů specifických pro daný vzorek. Většina vzorků pacientů vykazuje oba amplikony s délkovým rozdílem tří nukleotidů jako dvojitý pík v cílovém binu KMT2A::MLLT4. Jedná se o platný výsledek, nejsou nutná žádná nápravná opatření.

Jakákoli translokace KMT2A se může vyskytnout s bodem zlomu v exonu 9 (nejčastěji) nebo v exonu 10 a 11 (vzácně). Jakýkoli silný pík mimo žebříček v zeleném kanálu může pocházet z atypické translokace KMT2A a může být ověřen jinými metodami.

Transkripční varianta 6A cíle KMT2A::MLLT3 může v případě velmi vysokého vstupu a velmi vysoké kvality RNA produkovat dva detekovatelné amplikony, odpovídající píky jsou 6A\_S (short, požadováno) a 6A\_L (long, volitelné). Jedná se o nezbytný jev, který je vlastní designu primeru Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit. Jedná se o platný výsledek, nejsou nutná žádná nápravná opatření.

Vrchol mimo žebříček ve žlutém kanálu mezi biny PML::RARA\_bcr1 a bcr3 je s největší pravděpodobností způsoben variantou PML::RARA\_bcr2. Tento cíl má několik zlomových bodů v exonu 6 PML, a proto mu nelze přiřadit žádné konkrétní biny.

## Hodnocení výkonu

### Analytická citlivost

Typ vzorku pro soupravu Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit je definován jako cDNA transkribovaná z buněčné RNA izolované z periferní venózní krve nebo aspirátu kostní dřeně. Pro vzorky krve je možné měřit RNA v rozmezí od 50 ng do 1000 ng s dostatečnou výškou píku ABL-Control pomocí souprav cDNA synthesis kits SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) and High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), které byly validovány během tohoto hodnocení výkonu. Při předpokládané 100 % účinnosti transkripce to vede k rozmezí koncentrace cDNA od 2,5 ng/μL do 50 ng/μL. V PCR reakci se použije 1 μL cDNA. Pro vzorky kostní dřeně je pomocí SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) měřitelná RNA v rozmezí od 50 ng do 1 000 ng a pomocí High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) v rozmezí od 100 ng do 1 000 ng s dostatečnou výškou píku ABL-Control. Při předpokládané 100 % účinnosti transkripce to vede k rozmezí koncentrace cDNA 2,5 ng/μL, resp. 5 ng/μL až 50 ng/μL. V PCR reakci se použije 1 μL cDNA. Optimální vstupní množství RNA je definováno jako 1000 ng pro vzorky periferní krve a 500 ng pro vzorky kostní dřeně. V případě vzorků se špatnou koncentrací RNA nebo kritickými cíli lze vstup cDNA do PCR zvýšit až na 4 μL pro cDNA transkribovanou pomocí High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), bez ohledu na typ vzorku. Pro cDNA transkribovanou pomocí SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) je vstup cDNA omezen na maximálně 2 μL.

Limit of Blank (LoB) byl testován na 12 vzorcích různého původu při předem stanoveném optimálním vstupním množství. Jelikož v žádném z 12 testovaných vzorků nebyly detekovány žádné nespecifické píky nad

prahovou hodnotou 400 RFU v rozsahu 55 bp až 550 bp, lze stanovit prahovou hodnotu 400 RFU.

Limit of Detection (LoD) soupravy Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit byl testován na 6 umělých vzorcích s cDNA pozadím, pokrývajících všechny páry primerů v primerové směsi, přičemž páry primerů detekující více než jeden cíl amplifikovaly nejdelší a tudíž nejobtížněji detekovatelnou transkripční variantu cíle.

Souprava Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit vykazovala přijatelnou mez detekce podle akceptačních kritérií s maximální LoD 400 kopií pro testované cíle (viz [Tabulka 13](#)), s výjimkou KMT2A::MLLT4, který stále vykazoval přijatelný výsledek s LoD 1 000 kopií. Jelikož nebylo možné testovat všechny detekovatelné transkripční varianty genových fúzí, předpokládá se, že celková LoD 1 000 kopií, která byla nejvyšším výsledkem testovaných cílů, je bezpečně použitelná.

**Tabulka 13. LoD pro Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit.**

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

| Vzorek   | Cíl                     | LoD [kopie] |
|----------|-------------------------|-------------|
|          | MLLT10_240::PICALM_2092 | 200         |
|          | RUNX1::RUNX1T1          | 400         |
|          | DEK::NUP214             | 200         |
| Vzorek 5 | KMT2A::MLLT4 (short)    | 1000        |
| Vzorek 6 | KMT2A::MLLT4 (short)    | 500         |
|          | KMT2A::MLLT4 (long)     | 500         |

Jelikož je souprava Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit kvalitativní test určený k stanovení přítomnosti nebo absence cílového analytu, testování Limit of Quantitation (LoQ) se pro zamýšlené použití nepovažuje za relevantní.

## Analytická specifická

Automatické určování alel jsme testovali pomocí žebříčku alel a shody přiřazení alel ve srovnání s umělými vzorky translokačních cílů pomocí GeneMapper™ ID-X software. Na základě výsledků jsou definována specifická nastavení zařízení pro genotypizaci pomocí kapilární gelové elektroforézy (bins a panels) Genetic Analyzer.

PCR primery jsou navrženy tak, aby se vázaly komplementárně k oficiální referenční sekvenci lidského genomu. Genetické varianty, jako jsou Single Nucleotide Polymorphism (SNPs, INDELs nebo delece), mohou ovlivnit specifickou vazbu primerů a byly posouzeny na základě záznamů v databázi dbSNP, které jsou relevantní pro soupravu Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit. Jeden záznam (rs73504425) vede ke ztrátě funkce primeru. Variantní alela se vyskytuje u 0,6 % africké populace a nachází se v místě vazby primeru pro PICALM::MLLT10, vzácně hlášený fúzní gen s prevalencí < 1 %.

Dále bylo provedeno vyhledávání BLAST v lidském transkriptomu pro Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Primer mix, které neprokázalo žádné nespecifické amplifikační produkty v rozmezí 0–600 bp.

## Přesnost a pravdivost

Analytická přesnost Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit je založena na výsledcích studií správnosti soupravy. Společnost BIOTYPE GmbH se od roku 2013 aktivně účastní programu External Quality Assessment (EQA). Přítomnost nebo absence translokace ve vzorcích se stanoví na základě konsensu výsledků všech účastníků tohoto EQA. Od roku 2013 bylo analyzováno celkem 68 vzorků.

Na základě těchto výsledků byla vytvořena kontingenční matice založená na srovnání výsledků soupravy Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit (pozitivní/negativní) a skutečných výsledků (pozitivní/negativní), potvrzených konsensem všech účastníků programu External Quality Assessment program. Podle CLSI EP12 (3. vydání) byly na základě kontingenční matice vypočítány klíčové ukazatele výkonnosti uvedené v Tabulka 14.

**Tabulka 14 Analytické vlastnosti soupravy Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit.**

| Analytická vlastnost |             | Odhad  | Dolní 95% interval<br>spolehlivosti | Horní 95% interval<br>spolehlivosti |
|----------------------|-------------|--------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Analytická citlivost |             | 92,2 % | 81,5 %                              | 96,9 %                              |
| Analytická specifita |             | 94,1 % | 73,0 %                              | 99,0 %                              |
| Pozitivní hodnota    | prediktivní | 97,9 % | 89,1 %                              | 99,6 %                              |
| Negativní hodnota    | prediktivní | 80,0 % | 58,4 %                              | 91,9 %                              |
| Přesnost             |             | 92,6 % | 83,9 %                              | 96,8 %                              |

Tyto výpočty poskytují komplexní měřítko schopnosti soupravx Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit správně klasifikovat pozitivní a negativní případy s pravděpodobností 92 % a 94 %. Celkový podíl správných výsledků je 93 %, což svědčí o vysoké spolehlivosti. Souprava Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit vykazuje vysokou analytickou výkonnost, což potvrzuje účinnost a spolehlivost testu.

## Přesnost

Opakovatelnost a reprodukovatelnost testu jsme hodnotili na základě normy ISO 5725-2:2022-05 a CLSI EP05 (3. vydání). Pět umělých vzorků a Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control byly hodnoceny ve studii 5 x 5 x 3 (den x opakování x místo) prováděné na více místech. Studie prováděné na více místech zkoumá hlavní zdroj variability (opakovatelnost a reprodukovatelnost) v důsledku různých testovaných pracovišť, které budou představovat různé operátory měřící na různých pracovištích pomocí různých přístrojů. Výsledná opakovatelnost se pohybovala mezi 8,3 %CV a 15,6 %CV a reprodukovatelnost mezi 14,6 %CV a 30,5 %CV. Celkově souprava Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit vykazuje přijatelnou přesnost s  $SD_{Rep} \leq 2\,500$  RFU pro všechny specifické genové fúze testované s umělými vzorky 1 až 5 a pro Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control.

## Mezní hodnota testu

Souprava Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit využívá kvalitativní detekci genových fúzí pomocí PCR s koncovým bodem. Proto je jednou z relevantních mezních hodnot pro test minimální výška píku, která umožňuje bezpečně rozlišit mezi technickým šumem pozadí a skutečnou detekcí cíle. Hranice výšky píku RFU byla stanovena na 400 RFU s údaji z analytického testování citlivosti.

## Interferenty a křížové reakce

Potenciální interferenty, které by mohly ovlivnit výsledky postupu měření, byly vyhodnoceny v souladu s doporučeními pokynů CLSI EP07 (3. vydání) a EP37 (1. vydání). Pro soupravu Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit byly stanoveny endogenní a exogenní interferenty, byla testována jejich maximální očekávaná koncentrace ( $C_{max}$ ) v reakci PCR, jak je navrženo v pokynech, a v případě zjištění interferencí byly testovány další koncentrace, aby se určila taková koncentrace, při které nejsou interference detekovatelné.

Výsledky neprokázaly žádný rušivý účinek endogenní interferentní DNA testované v množství 1 ng v reakci PCR, pokud bylo štěpení DNA provedeno v rámci zpracování vzorku.

Vzhledem k tomu, že u endogenního interferentu z krve byl pozorován rušivý účinek při vypočtené  $C_{\max}$  0,87 % v/v v reakci PCR, byla testována další ředění, dokud nebyla detekována žádná interference. 0,087 % v/v krve nevykazovalo žádnou interferenci. Kontaminaci krví lze však vizuálně detekovat v PCR reakci nebo v izolované RNA podle oranžově zbarveného posunu. Pokud je pozorována změna barvy, doporučujeme izolaci RNA zopakovat, aby se zabránilo případné interferenci.

U exogenních interferentů DTT, RNase Inhibitor, DNase, Ethanol, Metoclopramide, EDTA, Hydroxyurea a Citrate nebyl pozorován žádný interferenční účinek při jejich příslušných  $C_{\max}$ , přičemž odchylky od neošetřené skupiny pozorované u testovaných vzorků byly v přijatelných mezích.

Pokud jde o exogenní interferenty reverzní transkriptázu, heparin a proteinázu K, byla pozorována interference při příslušné  $C_{\max}$  vypočtené nebo doporučené podle CLSI EP37 (1. vydání), další ředění byla testována, dokud nebyla zjištěna žádná interference. U enzymu reverzní transkriptázy testovaná  $C_{\max}$  0,2 % v/v vykazovala interferenci, pokud enzym nebyl tepelně inaktivován podle pokynů výrobců testovaných souprav pro syntézu cDNA. U heparinu 3,3 U/dl a enzymu proteinázy K 0,0001 % v/v se neprojevila žádná interference.

Krevní antikoagulans EDTA, citrát sodný a heparin byly dodatečně testovány pomocí doporučených izolačních souprav. Nebyl zjištěn žádný vliv na analytický výkon. Předpokládáme, že pracovní postup izolačních souprav účinně odstraní všechny testované rušivé látky pocházející z antikoagulancií a činidel pro izolaci RNA.

**Tabulka 15 Testované neinterferující koncentrace endogenních a exogenních interferentů.**

| Typ interferentu | Kategorie        | Interferent | Neinterferující testovaná koncentrace |
|------------------|------------------|-------------|---------------------------------------|
| Endogenní        | Složky plné krve | Plná krev   | 0,087 % v/v v reakci PCR              |
| Exogenní         | Antikoagulancia  | EDTA        | 0,099 mg/dL                           |
|                  |                  | Citrát      | 0,004 % v/v v reakci PCR              |

| Typ interferentu | Kategorie                             | Interferent          | Neinterferující testovaná koncentrace                   |
|------------------|---------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------|
|                  | Činidla pro izolaci RNA               | Heparin              | 3,3 U/dL                                                |
|                  |                                       | Proteinase K         | 0,0001 % v/v v reakci PCR                               |
|                  |                                       | Ethanol              | 0,3 % v/v v reakci PCR                                  |
|                  |                                       | DNase                | 0,16 % v/v v reakci PCR                                 |
|                  | Činidla pro reverzní transkripci cDNA | DTT                  | 0,2 % v/v v reakci PCR                                  |
|                  |                                       | RNase Inhibitor      | 0,2 % v/v v reakci PCR                                  |
|                  |                                       | Reverzní transkripce | 0,2 % v/v v reakci PCR<br><b>(tepelně inaktivováno)</b> |
|                  | Antiemetikum                          | Metoclopramide       | 0,225 mg/dL                                             |
|                  | Antineoplastikum                      | Hydroxyurea          | 3,08 mg/dL                                              |

## Stabilita při použití

Všechny studie stability byly naplánovány v souladu s normou ISO 23640:2015 a pokynem CLSI EP25- (2. vydání). Pro všechny studie stability byl použit následující postup: Souprava Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit byla testována v několika časových bodech po různé dlouhou dobu. Byly analyzovány umělé vzorky a Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control. Konečné vyhodnocení různých podmínek zahrnovalo srovnání průměrů počátečního časového bodu ( $T_0$ ) a následujících časových bodů ( $T_n$ ) a bylo vypočteno pomocí následující rovnice:

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

Pro studii stability při použití byly provedeny dva experimenty. Jeden pro testování stability po několika cyklech zmrazení a rozmrazení a druhý pro testování stability souprav během simulovaného použití po otevření v rámci studie stability po zmrazení a rozmrazení a deklarované doby použitelnosti.

Na základě výsledků je souprava Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit stabilní po dobu až 20 cyklů zmrazení a rozmrazení a lze ji používat až 24 měsíců po otevření.

## Data klinické funkční způsobilosti

### Návrh studie, etické a regulační aspekty

Souprava Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit a referenční metody byly testovány na 297 vzorcích pacientů a 10 zdravých dobrovolníků. Cílem této studie bylo poskytnout klinické důkazy podle § 20 až 24 zákona o zdravotnických prostředcích „Medizinproduktegesetz“. Pomocí referenčních cytogenetických metod (FISH) nebo interní validované monoplex-qPCR musela být prokázána shoda se zdravotnickým prostředkem. Potvrzení příslušné etické komise bylo obdrženo dne 06.06.2012.

### Referenční metody

Hlavním cílem je stanovení diagnostické citlivosti a specifčnosti ve srovnání s referenčními metodami. Jako referenční metoda byla pro vybrané translokace provedena Fluorescence-In-Situ-Hybridization (FISH) [Grimwade et al. Blood 116: 354-65, 2010]. Translokace, které nebylo možné řešit pomocí cytogenetiky, byly testovány pomocí monoplexních testů monoplex-nested-PCR zavedených a validovaných v testovací laboratoři [Steudel *et al.* Genes Chromosomes Cancer 37: 237-51, 2003, van Dongen *et al.* Leukemia 13: 1901-28, 1999].

### Extrakce a purifikace RNA

Mononukleární buňky (MNC) byly ze vzorků odebrány centrifugací v hustotním gradientu. Následně byla provedena izolace celkové RNA a reverzní transkripce do cDNA pomocí komerčně dostupných souprav. Kvalita cDNA byla analyzována pomocí PCR v reálném čase. K potvrzení fúzních genů a mutací sloužily validované jednoduché PCR testy.

### Výsledky

Souprava Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit nevykazovala žádné falešně pozitivní výsledky s testovanou cDNA 10 zdravých dobrovolníků.

Z 297 testovaných vzorků pacientů nebylo možné vyhodnotit 5 vzorků z důvodu detekce interní kontroly ABL pod doporučenou prahovou hodnotou. Ze zbývajících 292 vzorků vykázalo 201 pravdivé negativní výsledky ve srovnání s referenčními metodami.

Jednotlivé výsledky srovnávacích testů jsou shrnuty v Tabulka 16. Fúze genů PICALM::MLLT10 (CALM-AF10) a KMT2A::MLLT4 (MLL-AF6) nemohly být vyhodnoceny z hlediska diagnostické citlivosti, protože nebyly k dispozici žádné pozitivní předem charakterizované vzorky.

Celkově bylo dosaženo diagnostické citlivosti 94 % a diagnostické specifčnosti 99,5 %.

**Tabulka 16 Závěr výsledků klinické funkční způsobilosti Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit.** \*Údaje o prevalenci byly citovány z Grimwade et al. 2010. n.e. = nehodnoceno

| Biomarker          |                     | Hodnocení klinické funkční způsobilosti (n=292) |           |                    |                    |                   |                   |                             |                               |
|--------------------|---------------------|-------------------------------------------------|-----------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Genová fúze        | Zkratka chromozomu  | Varianta                                        | Prev* [%] | Pravdivě pozitivní | Pravdivě negativní | Falešně pozitivní | Falešně negativní | Diagnostic ká citlivost [%] | Diagnostic ká specifčnost [%] |
| RUNX1::RUNX1T1     | t(8;21)(q22;q22)    | n. b.                                           | 7         | 16                 | 275                | 0                 | 1                 | 94,1                        | 100,0                         |
| BCR::ABL           | t(9;22)(q34;q11)    | e1a3                                            | 1         | 1                  | 291                | 0                 | 0                 | 100,0                       | 100,0                         |
|                    |                     | e1a2                                            |           |                    |                    |                   |                   |                             |                               |
|                    |                     | b3a2                                            |           |                    |                    |                   |                   |                             |                               |
|                    |                     | b3a3                                            |           |                    |                    |                   |                   |                             |                               |
|                    |                     | b2a2                                            |           |                    |                    |                   |                   |                             |                               |
|                    |                     | b2a3                                            |           |                    |                    |                   |                   |                             |                               |
| PICALM::MLLT10     | t(10;11)(p13;q14)   | MLLT10_240-PICALM_1987                          | 1         | 0                  | 292                | 0                 | 0                 | n.e.                        | 100,0                         |
|                    |                     | MLLT10_240-PICALM_2092                          |           |                    |                    |                   |                   |                             |                               |
| CBFB::MYH11        | inv(16)(p13;q22)    | typ A                                           | 5         | 28                 | 262                | 0                 | 2                 | 93,3                        | 100,0                         |
|                    |                     | typ B                                           |           |                    |                    |                   |                   |                             |                               |
|                    |                     | typ C                                           |           |                    |                    |                   |                   |                             |                               |
|                    |                     | typ D                                           |           |                    |                    |                   |                   |                             |                               |
|                    |                     | typ E                                           |           |                    |                    |                   |                   |                             |                               |
|                    |                     | typ F                                           |           |                    |                    |                   |                   |                             |                               |
|                    |                     | typ G                                           |           |                    |                    |                   |                   |                             |                               |
|                    |                     | typ H                                           |           |                    |                    |                   |                   |                             |                               |
|                    |                     | typ J                                           |           |                    |                    |                   |                   |                             |                               |
| DEK::NUP214        | t(6;9)(p23;q34)     | n. b.                                           | 1         | 3                  | 289                | 0                 | 0                 | 100,0                       | 100,0                         |
| KMT2A::MLLT4       | t(6;11)(q27;q23)    | n. b.                                           | < 0,5     | 0                  | 292                | 0                 | 0                 | 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 částečný |                     | e9e3                                            | 5–7       | 23                 | 269                | 0                 | 0                 | 100,0                       | 100,0                         |

| Biomarker   |                    |          |           | Hodnocení klinické funkční způsobilosti (n=292) |                    |                   |                   |                            |                              |
|-------------|--------------------|----------|-----------|-------------------------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|----------------------------|------------------------------|
| Genová fúze | Zkratka chromozomu | Varianta | Prev* [%] | Pravdivě pozitivní                              | Pravdivě negativní | Falešně pozitivní | Falešně negativní | Diagnostická citlivost [%] | Diagnostická specifčnost [%] |
|             | tandem             | e10e3    |           |                                                 |                    |                   |                   |                            |                              |
|             | duplikace          | e11e3    |           |                                                 |                    |                   |                   |                            |                              |
| NPM1::MLF 1 | 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     |           |                                                 |                    |                   |                   |                            |                              |
| Shrnutí     |                    |          | 37        | 85                                              | 201                | 1                 | 5                 | 94,4                       | 99,5                         |

## Diagnostické hodnocení

Vlastnosti klinické funkční způsobilosti soupravy Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit vykazovaly přijatelné výsledky. Parametry pro hodnocení klinické funkční způsobilosti byly vypočteny podle přílohy I oddílu 9.1b nařízení IVDR (EU) 2017/746, jak je zobrazeno v Tabulka 17.

**Tabulka 17 Diagnostické vlastnosti soupravy Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit**

| Diagnostická vlastnost        | Odhad  | Dolní interval spolehlivosti | Horní interval spolehlivosti |
|-------------------------------|--------|------------------------------|------------------------------|
| Diagnostická citlivost        | 94,4 % | 87,7 %                       | 97,6 %                       |
| Diagnostická specifčnost      | 99,5 % | 97,3 %                       | 99,9 %                       |
| Pozitivní prediktivní hodnota | 98,8 % | 93,7 %                       | 99,8 %                       |
| Negativní prediktivní hodnota | 97,6 % | 94,4 %                       | 99,0 %                       |
| Diagnostická přesnost         | 98,0 % | 95,6 %                       | 99,1 %                       |

## Kontrola kvality

Všechny součásti soupravy procházejí intenzivním procesem kontroly kvality ve společnosti BIOTYPE GmbH. Kvalita testovacích souprav je trvale sledována, aby byla zajištěna jejich neomezená použitelnost. V případě jakýchkoli dotazů týkajících se zajištění kvality nás prosím kontaktujte.

## Technická pomoc

Pro technické poradenství se obraťte na náš tým zákaznické podpory:

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

**telefon:** +49 (0)351 8838 400

## Odkazy

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.

## Omezení použití

- Postupy uvedené v této příručce je třeba dodržovat podle popisu. Jakékoli odchylky mohou mít za následek selhání testu nebo způsobit chybné výsledky.
- Použití tohoto produktu je omezeno na profesionální laboratorní uživatele, kteří jsou speciálně vyškoleni v technikách PCR a kapilární gelové elektroforéze.
- Pro optimální provedení tohoto testu jsou nutné vhodné postupy odběru, přepravy, skladování a zpracování vzorků.
- Tento test nesmí být použit přímo na vzorku. Před použitím tohoto testu je třeba provést vhodné metody extrakce nukleových kyselin.
- Souprava byla ověřena pouze pro použití s činidly, přístroji a softwarem popsanými v kapitole Požadované materiály a zařízení, které nejsou součástí dodávky
- Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> byl navržen, validován a certifikován jako screeningový nástroj pro klasifikaci podtypů AML. Tato aplikace není vhodná pro kvantifikaci počtu kopií, jako je monitorování Minimal Residual Disease (MRD), ani pro validaci jiných podtypů leukémií nebo pediatrických AML.
- Vzhledem ke genetické variabilitě může mít single nucleotide polymorphism (SNPs) nebo krátký insertion deletion polymorphism (INDELs) vliv na účinnost primeru nebo dostupnost templátu. Analýza nejnovější verze sestavy lidského genomu (HG38) pro všechny etnické skupiny zjistila pouze jeden kritický jednonukleotidový polymorfismus (SNP), který vede ke ztrátě funkce primeru. Variantní alela se vyskytuje u 0,6 % africké populace a nachází se v místě vazby primeru pro PICALM::MLLT10, vzácně hlášený fúzní gen s prevalencí < 1 %. Vzhledem k nízké prevalenci genové fúze v kombinaci s nízkou pravděpodobností výskytu SNP ve světové populaci je však riziko falešně negativních výsledků nízké. V případě nejasností zvažte potvrzení výsledků pomocí referenčních metod.
- K zajištění funkčnosti soupravy je nutná správná laboratorní praxe.
- Výsledky musí interpretovat vyškolený zdravotnický pracovník.
- Interpretace výsledků musí počítat s možností falešně negativních a falešně pozitivních výsledků.
- Nepoužívejte prošlé nebo nesprávně skladované součásti

## Informace pro objednání

Objednávky zasílejte e-mailem na adresu [sales@biotype.de](mailto:sales@biotype.de).

| Produkt                                                 | Velikost balení | Objednací číslo |
|---------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Mentype® AMLplex <sup>QS</sup><br>PCR Amplification Kit | 25 reakcí       | 45-12100-0025   |
|                                                         | 100 reakcí      | 45-12100-0100   |
|                                                         | 400 reakcí      | 45-12100-0400   |
| Matrix Standard BT5 multi                               | 1x 25 µL        | 45-15100-0025   |
|                                                         | 2x 25 µL        | 45-15100-0050   |

## Ochranné známky a prohlášení o vyloučení odpovědnosti

Mentype® je registrovaná ochranná známka společnosti BIOTYPE GmbH.

Další ochranné známky: ABI PRISM®, GeneMapper®, SuperScript™, GeneAmp® a Applied Biosystems® (Applied Biosystems LLC group); QIAamp® (Qiagen); POP-4™, POP-1™, POP-7™ (Europe: Applied Biosystems LLC, US: Life Technologies Corporation). Na PCR se vztahují patenty. Držiteli patentů jsou společnosti Hoffmann-La Roche Inc. a F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Registrované názvy, ochranné známky apod. použité v tomto dokumentu, i když nejsou výslovně takto označeny, nelze považovat za nechráněné zákonem.

Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit je diagnostická souprava s označením CE podle evropského nařízení o diagnostice in vitro (EU) 2017/746.

Produkt není licencován Health Canada a není schválen FDA.

Není k dispozici ve všech zemích.

© 2025 BIOTYPE GmbH; všechna práva vyhrazena.

## Vysvětlení symbolů



Výrobce



Kód dávky



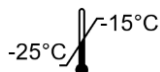
Obsahuje dostatečné množství činidel pro <N> testů



Přečtěte si elektronický návod k použití (eIFU)



Datum spotřeby



Teplotní limit



Katalogové číslo



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro



Chraňte před slunečním zářením



Udržujte v suchu



Unique device identifier

Další označení použité v tomto návodu k použití:



Užitečné tipy



Pozor, dbejte na dodržování tohoto upozornění!

[modře podtržený text](#)

Odkazy vedoucí na externí obsah, jako jsou domovské stránky, e-mailové adresy

černě podtržený text

Křížové odkazy v dokumentu pro snadnou navigaci

*odsazený, kurzívou psaný, tučně zvýrazněný text*

Pole, na která se má kliknout v softwaru

## Příloha

### Seznam cílových genů

| Gen     | Alternativní názvy                                           | ID transkripce     |
|---------|--------------------------------------------------------------|--------------------|
| RUNX1   | AML1, AMLCR1, CBFA2, PEBP2A2                                 | ENST00000675419.1  |
| RUNX1T1 | AML1T1, CBFA2T1, CDR, ETO, MTG8, ZMYND2                      | ENST00000523629.7  |
| BCR     | ALL, BCR1, CML, D22S11, D22S662, PHL                         | ENST00000305877.13 |
| ABL1    | ABL, C-ABL, JTK7, P150                                       | ENST00000318560.6  |
| MLLT10  | AF10                                                         | ENST00000307729.12 |
| PICALM  | CALM, CLTH                                                   | ENST00000393346.8  |
| CBFB    | PEBP2B                                                       | ENST00000412916.7  |
| MYH11   | SMHC, SMMHC, SMMS-1                                          | ENST00000300036.6  |
| DEK     | D6S231E                                                      | ENST00000652689.1  |
| NUP214  | CAIN, CAN, D9S46E, N214                                      | ENST00000359428.10 |
| KMT2A   | ALL-1, ALL1, CXXC7, HRX, HTRX, HTRX1, MLL, MLL1, MLL1A, TRX1 | ENST00000534358.8  |
| MLLT4   | AF-6, AF6, AFDN                                              | ENST00000683244.1  |
| MLLT3   | AF-9, AF9, YEATS3                                            | ENST00000380338.9  |
| ELL     | C19ORF17, ELL1, MEN, PPP1R68                                 | ENST00000262809.9  |
| NPM1    | B23, NPM                                                     | ENST00000296930.10 |
| MLF1    | -                                                            | ENST00000466246.7  |
| PML     | MYL, RNF71, TRIM19                                           | ENST00000268058.8  |
| RARA    | NR1B1, RAR, RAR-ALPHA, RARALPHA                              | ENST00000254066.10 |

## Elektroferogramy referenčních vzorků

Na následujících stránkách najdete příklady elektroferogramů Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder (Obrázek 2), Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control (PC, Obrázek 3) a kontroly bez tepláku (NTC, Obrázek 4).

Všechny vzorky byly amplifikovány na PCR cykleru ProFlex a analyzovány na 3500 Genetic Analyzer (POP-4, 36 cm testovací soubor) s použitím validovaného parametru cyklu. Analýza dat byla provedena pomocí nástroje GeneMapper ID-X verze 1.6. Byly použity Bins, Panels, a Analysis method podle Tabulka 11.

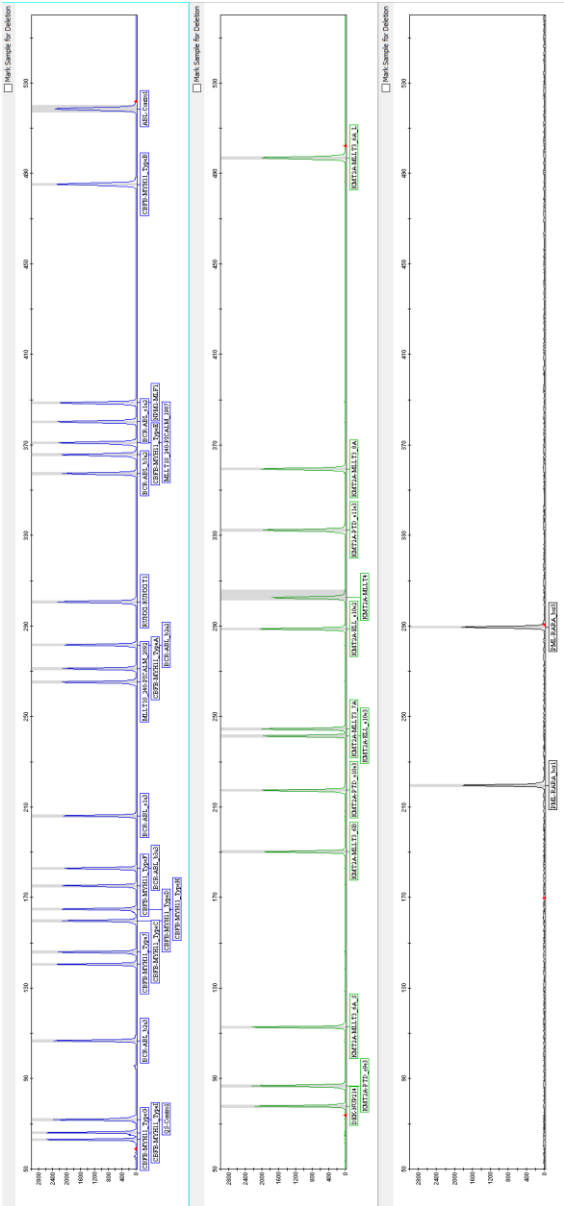
Elektroferogramy jsou zvětšeny na délku fragmentu 50–560 bp (osa x). Škálování osy y bylo provedeno individuálně:

Obrázek 2, strana 55: Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder: 3 000 RFU

Obrázek 3, strana 56: Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Positive Control: 9 000 RFU

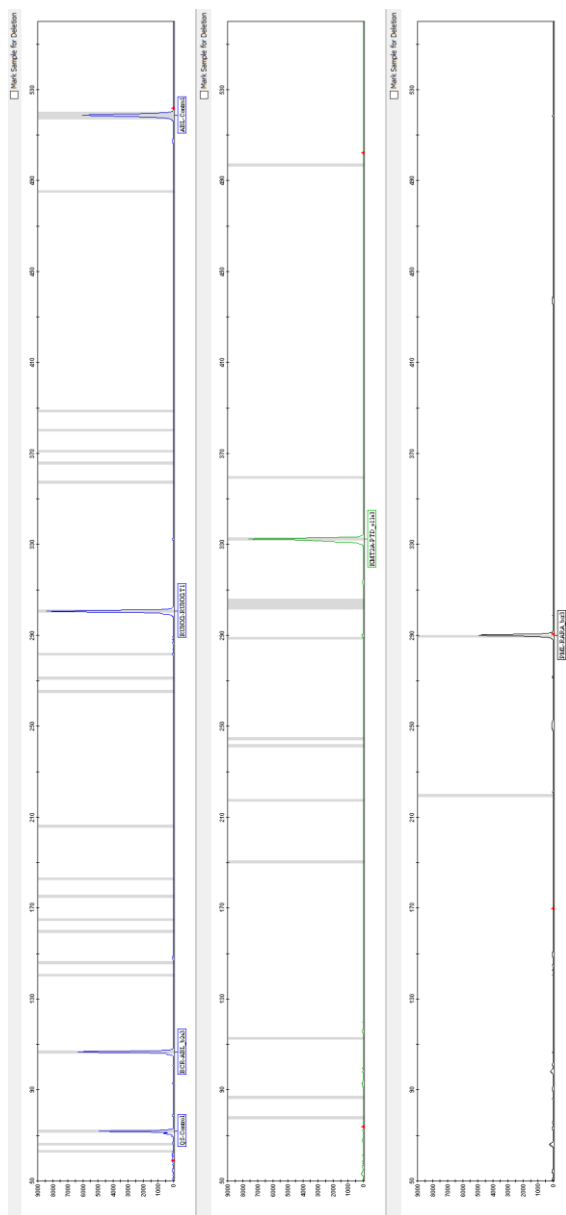
Obrázek 4, strana 57: : Kontrola bez tepláku (NTC): 9 000 RFU

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



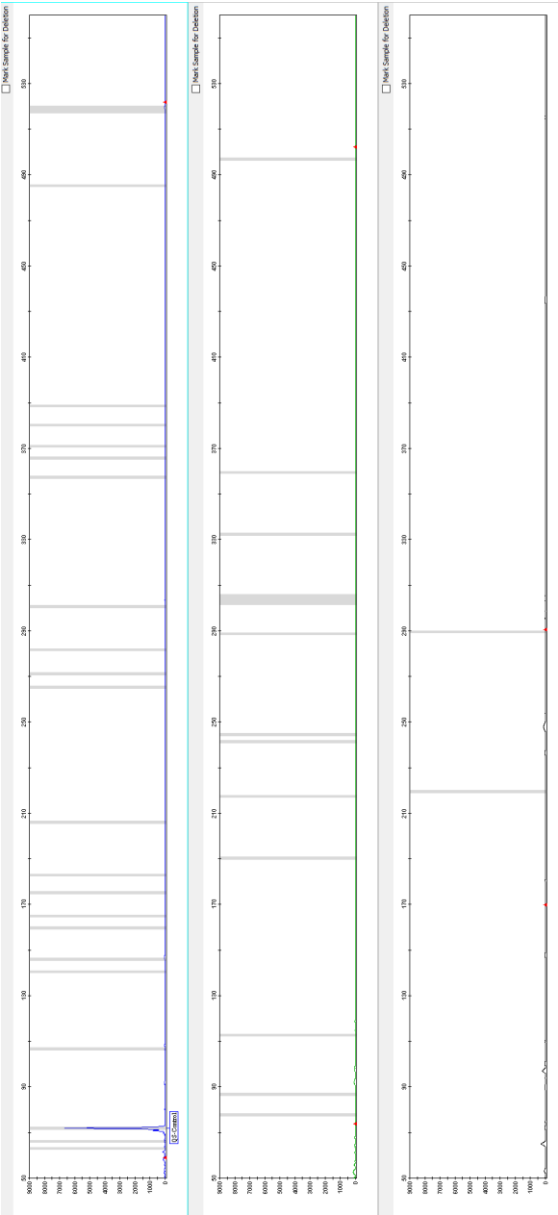
Obrázek 2 Mentype® AMLplex<sup>QS</sup> Allelic Ladder

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



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

No template control (NTC)



Obrázek 4 No template control (NTC)

---

**BIOTYPE GmbH**

Moritzburger Weg 67

01109 DRESDEN

GERMANY

Tel.: +49 351 8838 400

Fax: +49 351 8838 403

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

**Objednávky**

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

**Zákaznický servis a podpora**

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

