Mentype® AMLplex^QS

PCR Amplification Kit

Návod na použitie (IFU)

IVD CE 0483 Na diagnostické použitie in vitro

AMLIFU02v2sk
23.07.2025

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

LOT Kód dávky

BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY
Webová lokalita: www.biotype.de
E-mail: support@biotype.de
Objednávanie: sales@biotype.de

BIOTYPE

Oznámenie o zmene

Upozorňujeme na nasledujúce úpravy v porovnaní s predchádzajúcou verziou IFU:

Kód dokumentu	Zmeny	Dátum
AMLIFU02v1sk	Počiatočná verzia	28.05.2025
AMLIFU02v2sk	Aktualizácia tabuľky 8	23.07.2025

Tlačenú verziu tohto IFU vám môžeme poskytnúť bezplatne do 7 dní.

V prípade akýchkoľvek ďalších otázok nás kontaktujte

na čísle +49 351 8838 400 alebo support@biotype.de

Obsah

Zamýšľaný účel **4**
Vedecké pozadie **4**
Popis produktu **5**
Poskytnuté materiály **7**
Popis komponentov **8**
Skladovanie činidiel a manipulácia s nimi **9**
Požadovaný, ale nedodaný materiál a zariadenia **9**
Všeobecné laboratórne vybavenie 9
Činidlá, súpravy a spotrebný materiál 10
Nástroje a softvér 11
Vzorky a skúšobné vzorky 12
Upozornenia a bezpečnostné opatrenia **13**
Upozornenie pre používateľa **14**
Postup **15**
Prehľad experimentálneho pracovného postupu 15
Príprava vzorky 15
Príprava kontroly 19
Nastavenie hlavného mixu 19
PCR amplifikácia 21
Kapilárna gélová elektroforéza **23**
Príprava PCR produktov 23
Analýza dĺžky fragmentov 24
Analýza údajov **26**
Všeobecný postup analýzy údajov 26
Analýza vzoriek 30
Analýza údajov pomocou GeneMapper™ ID-X 32

Riešenie problémov **35**
Hodnotenie výkonu **38**
Kontrola kvality **48**
Technická pomoc **48**
Referencie **49**
Obmedzenia používania **49**
Informácie o objednávaní **51**
Ochranné známky a odmietnutie zodpovednosti **51**
Vysvetlenie symbolov **52**
Príloha **54**

Zamýšľaný účel

Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit je manuálny test určený na kvalitatívny skríning 11 génových fúzií s celkovým počtom 34 variantov transkriptov, ktorý umožňuje identifikáciu chromozomálnych aberácií s diagnostickým, prognostickým a terapeutickým významom pre dospelých pacientov trpiacich alebo podozrivých na akútnu myeloidnú leukémiu (AML).

Test sa má používať s komplementárnou DNA (cDNA), ktorá bola spätne prepisovaná z bunkovej RNA, ktorá bola extrahovaná zo vzoriek periférnej žilovej plnej krvi alebo kostnej drene.

Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit sa používa na detekciu chromozómových aberácií pre klinické rozhodnutia relevantné pri akútnej myeloidnej leukémii. Identifikácia špecifických genetických translokácií umožňuje klasifikáciu leukemických ochorení a poskytuje základné informácie pre diagnostické zdôvodnenie určujúce rizikovo orientovanú liečbu pacientov.

Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit je určený pre profesionálnych používateľov laboratórií, ktorí sú vyškolení v oblasti molekulárno-genetických techník, multiplexnej PCR a manipulácie s Genetic Analyzer Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems divízie).

Vedecké pozadie

Overenie špecifických chromozómových aberácií má vysokú prognostickú hodnotu takmer u všetkých typov akútnej leukémie. Molekulárno-biologický dôkaz chromozómových aberácií (translokácií) predstavuje dôležité doplnenie diagnostiky. Zisťovanie špecifických translokácií umožňuje klasifikáciu podtypov leukemických ochorení a poskytuje dôležité informácie pre rizikovo orientovanú liečbu pacientov.

Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit uľahčuje detekciu najčastejších chromozómových aberácií, ktoré sa doteraz pozorovali v AML, a predstavuje jednoducho použiteľný, rutinne kompatibilný a spoľahlivý skríningový nástroj.

Popis produktu

Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit obsahuje optimalizované reagencie na vysokorozlišovaciu detekciu 11 fúznych génov s celkovým počtom 34 transkripčných variantov (pozri Tabuľka 1). Názvy variantov sa riadia historicky zaužívanou nomenklatúrou, najmä pre KMT2A (Schnittger et al., 2000). Úplný zoznam génov, ich alternatívne názvy a identifikátory transkriptov používané na systematický popis variantov nájdete v prílohe (pozri Zoznam cieľových génov).

Testovacia súprava obsahuje internú kontrolu PCR (Quality Sensor “QS-Control”), ktorá je nezávislá od šablóny, a kontrolu cDNA závislú od šablóny (ABL-Control), ktorá poskytuje užitočné informácie o účinnosti PCR, kvalite použitých šablón cDNA a prítomnosti inhibítorov PCR.

Test sa vykonáva analýzou fragmentov pomocou kapilárnej gélovej elektroforézy. Jeden primér pre každý transkript je fluorescenčne označený s 6-FAM, BTG alebo BTY, farebné spektrum príslušenstva Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE, GmbH).

Tabuľka 1 Fúzie génov a varianty transkriptov zistiteľné pomocou Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit

Fúzia génov	Chromozomálna aberácia	Variant	Systematický opis variantu
RUNX1::RUNX1T1	t(8;21) (q22;q22.1)	-	RUNX1:e6::RUNX1T1:e3
BCR::ABL	t(9;22) (q34.1;q11.2)	e1a3	BCR:e1::ABL1:e3
		e1a2	BCR:e1::ABL1:e2
		b3a2	BCR:e14::ABL1:e2
		b3a3	BCR:e14::ABL1:e3
		b2a2	BCR:e13::ABL1:e2
		b2a3	BCR:e13::ABL1:e3
PICALM::MLLT10	t(10;11) (p12.3;q14.2)	MLLT10_240-PICALM_1987	MLLT10:e3::PICALM:e19
		MLLT10_240-PICALM_2092	MLLT10:e3::PICALM:e20
CBFB::MYH11	inv(16) (p13.1;q22)	Type A	CBFB:e5::MYH11:e33
		Type B	CBFB:e5::MYH11:e32
		Type C	CBFB:e5::MYH11:e31
		Type D	CBFB:e5::MYH11:e29
		Type E	CBFB:e5::MYH11:e28
		Type F	CBFB:e4::MYH11:e33
		Type G	CBFB:e4::MYH11:e29

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

Test bol validovaný pomocou skríningu génovej fúzie u približne 300 AML pacientov a jeho vhodnosť bola potvrdená v porovnávacej klinickej hodnotiacej štúdii.

Limit detekcie pre kvalitatívne hodnotenie je 400 RFU. V priemere možno zistiť minimálne 1000 kópií pre každú génovú fúziu.

Všeobecný rozsah vstupu za štandardných podmienok do reverznej transkripčnej reakcie je definovaný ako 100 ng až 1 µg celkového RNA izolovaného z celej krvi alebo kostnej drene.

Optimálny vstup do reverznej transkripcie pre kostnú dreň je definovaný ako 500 ng RNA a 1 µg RNA pre periférnu krv. 1 µL roztoku cDNA sa potom použije počas PCR.

Poskytnuté materiály

Tabuľka 2 Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kitobsah

Činidlo	Farba uzáveru		Objem na veľkosť balenia		
			25 reakcií	100 reakcií	400 reakcií
Nuclease-Free Water	Svetlomodrá		1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Fialová		125 µL	500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® AMLplex^QS Primer Mix	Červená		63 µL	250 µL	4 x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Biela		10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® AMLplex^QS Positive Control	Biela		25 µL	25 µL	25 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Oranžová		13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® AMLplex^QS Allelic Ladder	Zelená		25 µL	25 µL	4 x 25 µL

Prehľad čísel šarží komponentov nájdete na štítku, ktorý sa nachádza na vnútornej strane chlopne škatule.

POZNÁMKA

Upozorňujeme, že veľkosť balenia opisuje počet testov **bez zohľadnenia** počtu požadovaných kontrol alebo požadovaného prebytku na pipetovanie.

Pre zodpovedajúcu priepustnosť odporúčame použiť nasledujúcu veľkosť:

- < 8 vzoriek na jeden PCR cyklus: veľkosť balenia 25 reakcií
- 8 - 45 vzoriek na jeden PCR cyklus: veľkosť balenia 100 reakcií
- > 45 vzoriek na jeden PCR cyklus: veľkosť balenia 400 reakcií

Popis komponentov

Nuclease-Free Water: PCR voda triedy, ktorá sa používa v PCR zostave a ako kontrola bez šablóny (NTC).

Reaction Mix A: PCR pufr obsahujúci dNTPs a $MgCl_2$. Pufr PCR je optimalizovaný tak, aby podporoval aktivitu enzýmov pri PCR.

Mentype® AMLplex^QS Primer Mix: multiplexná zmes oligonukleotidových primerov obsahujúca značený primer (značka: 6-FAM™, BTG, BTY) a neznačené primery.

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

Mentype® AMLplex^QS Positive Control: dvojvláknová umelá DNA zmes piatich DNA-fragmentov. Používa sa ako kvalitatívna externá kontrola PCR, ktorá je pozitívna pre nasledujúce ciele na všetkých troch paneloch: BCR::ABL_b2a3, RUNX1::RUNX1T1, ABL-control, KMT2A-PTD_e11e3 a PML::RARA_bcr3, . Okrem toho sa QS-Control amplifikuje ako kvalitatívny marker pre validitu vzorky.

POZNÁMKA

i

Mentype® AMLplex^QS Positive Control je pre laboratórneho pracovníka kritická, pretože pozostáva z jednotlivých molekúl DNA, ktoré boli prečistené, nie sú nebezpečné a nemajú aktívne biologické funkcie. Neobsahuje žiadne živé bunky ani patogénne organizmy, ktoré by mohli predstavovať priamu hrozbu.

DNA Size Standard 550 (BTO): zmes fluorescenčne označených fragmentov PCR s definovanými dĺžkami fragmentov v rozmedzí 60-550 bp, zložka sa pridáva ku každému produktu PCR pred analýzou dĺžky fragmentov, používa sa na regresiu veľkosti na presné určenie dĺžky fragmentov produktov PCR.

Mentype® AMLplex^QS Allelic Ladder: zmes fluoroforom označených fragmentov PCR, ktoré predstavujú všetky detekovateľné alely Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit. Obsahuje 22 fragmentov označených s 6-FAM™, 12 fragmentov označených s BTG a 2 fragmenty

označené s BTY, ktoré sa používajú ako genotypová referencia na presnú identifikáciu alely.

Skladovanie činidiel a manipulácia s nimi

Súprava sa dodáva na suchom ľade. Komponenty súpravy by sa mali dodať zmrazené, okrem Multi Taq 2 DNA Polymerase, ktorý je uložený v pufri zabraňujúcom zmrazeniu činidla.

Pri prevzatí súpravy skontrolujte jej úplnosť. Nepoužívajte súpravy, ktoré boli pri príchode rozmrazené. Ak jeden alebo viacero komponentov nie je zmrazených alebo ak boli počas prepravy poškodené trubice alebo obal, nie je možné zaručiť výkon.

Všetky zložky skladujte pri teplote -25 °C až -15 °C, chránené pred svetlom. Predovšetkým Mentype® AMLplex^QS Primer Mix, DNA Size Standard 550 (BTO)a Mentype® AMLplex^QS Allelic Laddermusia byť skladované chránené pred svetlom.

Aby sa zabránilo kontaminácii, odporúčame, aby sa preamplifikačné komponenty (vzorky RNA a cDNA, Mentype® AMLplex^QS Positive Control)) a postamplifikačné komponenty (DNA Size Standard 550 (BTO)a Mentype® AMLplex^QS Allelic Ladder) skladovali a používali oddelene od činidiel PCR (Nuclease-Free Water, Multi Taq 2 DNA Polymerase, Reaction Mix A a Mentype® AMLplex^QS Primer Mix).

Platnosť súpravy uplynie podľa informácií uvedených na štítku súpravy alebo 24 mesiacov po otvorení, podľa toho, čo nastane skôr. Neprekračujte maximálne 20 zmrazovacích a rozmrazovacích cyklov.

Požadovaný, ale nedodaný materiál a zariadenia

Všeobecné laboratórne vybavenie

- Stolná centrifúga s rotorom pre 2 mL a 200 µL reakčné skúmavky
- Odstredivka s rotorom pre mikrotitračné platne pre 96-jamkové reakčné platne
- Vírový mixér
- Kalibrované nastaviteľné pipety so špičkami filtrov s tesným aerosólom na likvidáciu

- Vhodné 200 µL 96-jamkové reakčné platne alebo 200 µL reakčné skúmavky s príslušným uzatváracím materiálom, trieda PCR
- Vhodné stojany pre 2 mL a 200 µL reakčné skúmavky
- Chladiaci stojan vhodný pre 2 mL skúmavky
- Jednorazové rukavice bez prášku
- NanoDrop™ One Spectrophotometer alebo Qubit™ Fluorometer

POZNÁMKA

Všetky materiály použité na PCR by mali mať primeranú kvalitu (bez DNA a pre molekulárnu biológiu). Uistite sa, že všetky použité prístroje boli nainštalované, kalibrované, skontrolované a udržiavané podľa pokynov a odporúčaní výrobcov.

Činidlá, súpravy a spotrebný materiál

Tabuľka 3 Potrebné, ale nedodané činidlá

Upozorňujeme, že niektoré činidlá a spotrebný materiál sa používajú v špecifických kombináciách a nie všetky sú potrebné pre každý cyklus.

Činidlo	Dodávateľ	Objednávacie 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 4374967
SuperScript™ IV First Strand cDNA Synthesis System	Thermo Fisher Scientific	18091050, 18091200
Hi-Di™ Formamide, 25 mL	Thermo Fisher Scientific	4311320
POP-4™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 samples)	Thermo Fisher Scientific	4393715

Činidlo	Dodávateľ	Objednávacie číslo
POP-7™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers (384 samples)	Thermo Fisher Scientific	4393708
Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series	Thermo Fisher Scientific	4393927
Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series	Thermo Fisher Scientific	4408256
3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 36 cm	Thermo Fisher Scientific	4404683
3500 Genetic Analyzer 8-Capillary Array 50 cm	Thermo Fisher Scientific	4404685
SeqStudio™ Cartridge	Thermo Fisher Scientific	A33671 A41331
SeqStudio™ Cathode Buffer	Thermo Fisher Scientific	A33401

Nástroje a softvér

Okrem manuálnych metód extrakcie na báze stĺpcov, ako je popísané v kapitole Príprava vzorky, možno na extrakciu RNA použiť nasledujúcu automatizáciu:

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

Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kitbola overená na použitie s nasledujúcimi cyklérmi PCR:

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

Použitie iných PCR cyklátorov, ako je uvedené vyššie, musí overiť používateľ. Musia byť splnené tieto požiadavky:

- Vyhrievané veko
- Blok vhodný pre 200 µL reakčné platne/skúmavky
- Ramping nastaviteľný na 4 °C/s

Mentype® AMLplexQS PCR Amplification Kitbola overená na použitie s týmito nástrojmi a nastaveniami.

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

Analýza údajov bola vykonaná pomocou softvéru:

- GeneMapper™ ID-X software, verzia 1.6 (Thermo Fisher Scientifc), pomocou špecifického produktu:
    - Analysis Methods: AMLplexIVD_Analysis1_v1x alebo AMLplexIVD_Analysis4_v1x alebo AMLplexIVD_Analysis7_v1x
    - Bins: AMLplexIVD_Bins1_v1x alebo AMLplexIVD_Bins4_v1x alebo AMLplexIVD_Bins7_v1x
    - Panels: AMLplexIVD_Panel1_v1x alebo AMLplexIVD_Panel4_v1x alebo AMLplexIVD_Panel7_v1x
    - Size Standard: BTO_60-550_v1x

Ručné vyhodnotenie súborov fsa alebo akýchkoľvek výsledkov poskytnutých pomocou softvéru na zber údajov bez softvéru opísaného na analýzu a vyhodnotenie údajov nie je validované.

POZNÁMKA

Uistite sa, že všetky použité nástroje boli nainštalované, kalibrované, skontrolované a udržiavané podľa pokynov a odporúčaní výrobcu.

Vzorky a skúšobné vzorky

Nasledujúce vzorky boli overené pomocou Mentype® AMLplexQS PCR Amplification Kit:

- Vzorky periférnej venóznej krvi človeka (EDTA, citrát, heparín a stabilizátor RNA Exact), skladované pri teplote 4 °C a spracované na purifikáciu RNA do 24 hodín.
- Vzorky kostnej drene (EDTA, heparín), skladované pri teplote 4 °C a spracované na RNA purifikáciu do 24 hodín.

Získaná RNA sa skladuje nezriedená pri teplote -85 °C až -70 °C.

POZNÁMKA

Uistite sa, že antikoagulant použitý na odber krvi je kompatibilný s pokynmi výrobcu súpravy na izoláciu RNA.

Upozornenia a bezpečnostné opatrenia

- Pred použitím výrobku si pozorne prečítajte návod na použitie.
- Prečítajte si karty bezpečnostných údajov (SDS) a vyhlásenia o neškodnosti (NHS) pre všetky výrobky BIOTYPE, ktoré sú k dispozícii na požiadanie alebo prostredníctvom (www.biotype.de/en/sicherheitsdatenblatter). Pre výrobky, ktoré nevyžadujú SDS, pretože neobsahujú SVHC alebo podliehajú iným obmedzeniam nariadenia 1272/2008 (CLP), poskytuje BIOTYPE SDS na požiadanie.
- V prípade dodatočne potrebných činidiel sa obráťte na výrobcov požadovaných, ale nedodaných materiálov a činidiel, aby vám poskytli kópie SDS.
- Komponenty súpravy z rôznych šarží súpravy sa nesmú miešať.
- Alikvotovanie zložiek súpravy do iných reakčných nádob nie je povolené.
- Používanie tohto produktu je obmedzené na profesionálnych používateľov laboratórií, ktorí sú vyškolení v oblasti molekulárno-genetických techník, multiplexnej PCR a manipulácie s Genetic Analyzers z Thermo Fisher Scientific.
- Pred prvým použitím skontrolujte, či výrobok a jeho súčasti:
  - Integrita
  - Úplnosť, pokiaľ ide o počet, typ a náplň (pozri kapitolu Poskytnuté materiály)
  - Správne označenia
  - Mrazivosť pri príchode (okrem Multi Taq 2 DNA Polymerase)

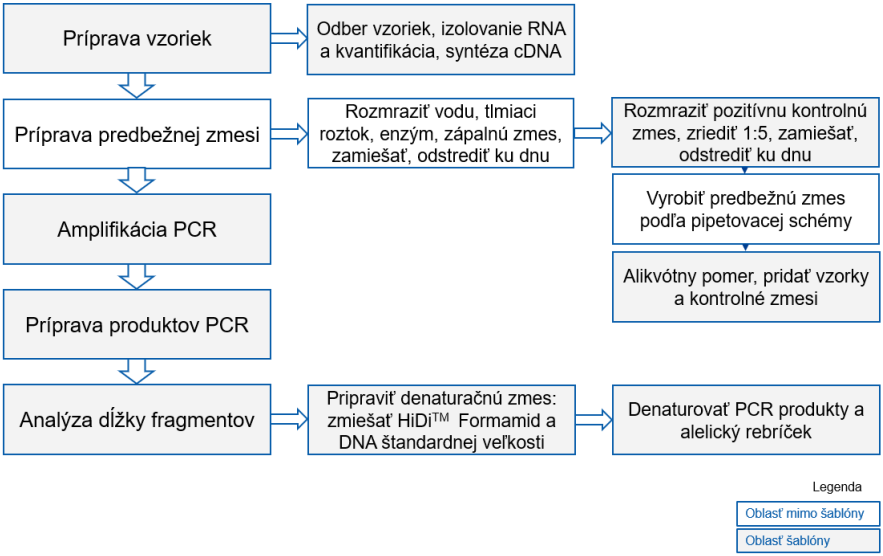
- So vzorkami by sa malo vždy zaobchádzať ako s infekčnými a/alebo biologicky nebezpečnými v súlade s bezpečnými laboratórnymi postupmi.
- Nepoužívajte súpravu, ktorej uplynula doba použiteľnosti.
- Vzorky a odpad z analýzy zlikvidujte v súlade s miestnymi bezpečnostnými predpismi.
- Všetky použité prístroje boli nainštalované, kalibrované, kontrolované a udržiavané podľa pokynov a odporúčaní výrobcu.

Upozornenie pre používateľa

Každý problém, ktorý sa vyskytne v súvislosti s výrobkom, musí používateľ nahlásiť výrobcovi. Akékoľvek závažné udalosti súvisiace s touto súpravou sa musia nahlásiť výrobcovi a príslušnému orgánu členského štátu, v ktorom je používateľ a/alebo pacient usadený. Súhrn bezpečnosti a výkonu ((SSP) je vytvorený v súlade s článkom 29 nariadenia (EU) 2017/746 a jeho cieľom je poskytnúť verejnosti prostredníctvom databázy EUDAMED prístup k aktualizovanému súhrnu údajov o bezpečnosti a výkone pomôcky určeným používateľom, v prípade tohto výrobku len laboratórnym odborníkom.

Postup

Prehľad experimentálneho pracovného postupu



Príprava vzorky

Požiadavky na surovú vzorku

Vzorka pre Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit je definovaná ako cDNA prepisovaná z RNA extrahovanej z periférnej žilovej plnej krvi alebo kostnej drene odobratej ľuďom.

Odporúčame používať činidlá na stabilizáciu RNA počas odberu vzoriek. Stabilizátory RNA pomáhajú zachovať integritu RNA (napr. S-Monovette RNA Exact). Izolácia RNA by sa mala vykonať okamžite po odbere vzorky.

POZNÁMKA

Dlhé skladovanie surového materiálu vzorky by mohlo viesť k fragmentácii genetického materiálu, a tým k nedostatočnej kvalite materiálu. To môže zhoršiť výsledok analýzy, napr. v dôsledku neúplných profilov.

Krv

Na nasledujúci postup odoberte aspoň 200 µL vzorky periférnej venóznej plnej krvi.

S manipuláciou s periférnou plnou krvou sa treba riadiť odporúčaním Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline MM05–A2 (2nd edition),, kde sa uvádza, že celá krv sa môže skladovať pri izbovej teplote (22 °C až 25 °C) maximálne 24 hodín alebo pri teplote 2 °C až 6 °C 72 hodín alebo dlhšie. Okrem toho sa odporúča, aby sa pri odbere celej krvi používali antikoagulanciá EDTA, citrát alebo heparín.

Kostná dreň

Odoberte aspoň 200 µL vzorky kostnej drene na nasledujúci postup.

Manipulácia s aspirátmi kostnej drene by sa mala riadiť odporúčaním CLSI guideline MM05–A2 (2nd edition), kde sa uvádza, že antikoagulované (EDTA alebo citrátové) aspiráty kostnej drene by sa mali skladovať a prepravovať pri teplote 4 °C. RNA by sa mala extrahovať do 1 h - 4 h po odbere vzorky, aby sa dosiahli najlepšie výsledky.

RNA extrakcia

Extrakciu a purifikáciu RNA z periférnej plnej krvi (PB) alebo aspirátu kostnej drene (BM) vykonajte pomocou jednej z nasledujúcich súprav:

- RNeasy® Midi/ Mini/ Plus Mini Kit (Qiagen GmbH) pre antikoagulanciá EDTA, citrát a heparín na BM a PB
- NucleoSpin® Dx RNA Blood (Macherey-Nagel) pre stabilizátor RNA Exact na PB
- Maxwell® CSC RNA Blood Kit (Promega) pre antikoagulanciá EDTA a heparín na BM

Pri extrakcii RNA postupujte podľa príručiek a odporúčaní výrobcu. Počas izolácie sa odporúča vykonať **rozklad DNase** podľa pokynov výrobcu.

POZNÁMKA

Kontaminácia krvi sa dá vizuálne zistiť v reakcii PCR alebo v izolovanej RNA pomocou oranžového farebného posunu. Ak dôjde k zmene farby, odporúčame izoláciu RNA zopakovať, aby sa predišlo prípadným interferenciám

POZNÁMKA

Pred elúciou nukleovej kyseliny sa uistite, že ste odstránili všetky stopy etanolu. Etanol je silný inhibítor PCR.

RNA kvantifikácia a riedenie

Kvantifikujte koncentráciu RNA pomocou UV/VIS spektroskopie pri 260 nm s použitím NanoDrop™ One spectrophotometer alebo pomocou fluorescenčnej spektroskopie s použitím Qubit™ Fluorometer.

Pri použití spektrofotometrie použite na meranie slepého pokusu elučný pufr zo súpravy na extrakciu RNA. Pomer A260/A280 je v rozsahu 1,9 - 2,1, zatiaľ čo pomer A260/A230 je v rozsahu 1,8 - 2,3.

Na fluorometrickú kvantifikáciu RNA možno použiťQubit™ Fluorometer s Qubit™ RNA HS Assay-Kit alebo Qubit™ RNA BR Assay-Kit .

Na použitie s Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit zrieďte vzorky RNA na vhodnú koncentráciu na následný prepis do cDNA. Riedenie pripravte čerstvo pred použitím. Ako riedidlo použite vodu bez nukleáz.

POZNÁMKA

Vstupný rozsah pre prepis do cDNA sa riadi pokynmi výrobcu prepisovacej súpravy. Použitie 100 ng - 1 µg RNA v konečnom reakčnom objeme 20 µL na syntézu cDNA je validované pre oba typy vzoriek. Odporúčame použiť optimálnu hodnotu **500 ng pre kostnú dreň** a **1 µg pre periférnu krv**.

RNA skladovanie

Neriedené vzorky RNA skladujte vo vode bez RNA pri teplote -25 °C až -15 °C do 24 hodín alebo pri teplote -85 °C až -70 °C do jedného roka.

Transcripcia do cDNA

Syntézu cDNA vykonajte podľa pokynov výrobcu s použitím jednej z nasledujúcich súprav:

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

*odporúča sa pre malé množstvo RNA

POZNÁMKA

Tepelná inaktivácia reverznej transkriptázy je rozhodujúca pre výkon PCR. Podrobnosti nájdete v návode výrobcu.

cDNA skladovanie

Vzorky cDNA skladujte pri teplote -25 °C až -15 °C až jeden rok.

Príprava kontroly

Pozitívna kontrola (PC)

Rozmrazte Mentype® AMLplex^QS Positive Control, homogenizujte ju vírivým miešaním a následným krátkym odstreďovaním.

Zrieďte Mentype® AMLplex^QS Positive Control v pomere 1:5 pomocou Nuclease-Free Water, ktorý je súčasťou súpravy. Napr. zmiešajte 1 µL kontroly s 4 µL Nuclease-Free Water.

Zriedenú PC homogenizujte krátkym vírením. Potom zriedený roztok PC krátko odstreďte (cca 5 s).

Zriedenú pozitívnu kontrolu neskladujte.

POZNÁMKA

Vždy použite čerstvé riedenie Mentype® AMLplex^QS Positive Control

Žiadna kontrola šablón NTC

Aplikujte vodu bez nukleázy, ktorá je súčasťou súpravy, ako kontrolu NTC bez templátu namiesto vzorky.

Nastavenie hlavného mixu

Vyberte a rozmrazte nasledujúce komponenty z Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit :

- Nuclease-Free Water (svetlomodré veko)
- Reaction Mix A(fialové veko)
- Mentype® AMLplex^QS Primer Mix (červené veko)
- Multi Taq 2 DNA Polymerase (biele veko)

Všetky zmrazené zložky by sa mali rozmraziť pri izbovej teplote (22 °C až 25 °C, približne 30 minút, chránené pred svetlom) a homogenizovať prevrátením skúmaviek alebo jemným vírením. Potom činidlá krátko odstreďte (približne 5 s). Pred prípravou hlavnej zmesi sa odporúča

uchovávať Multi Taq 2 DNA Polymerase čo najdlhšie v chladenom prostredí (napr. na chladiacej mriežke).

POZNÁMKA

Pre dlhšiu stabilitu zmiešajte Multi Taq 2 DNA Polymerase premiešaním - **enzým nemiešajte vírom**.

Pripravte PCR hlavný mix podľa Tabuľka 4 v mikrocentrifugačnej skúmavke vhodnej veľkosti pre celkový počet vzoriek, ktoré sa majú testovať, vo vyhradenom čistom priestore. Do výpočtu zahrňte aspoň jeden PC a jeden NTC.

POZNÁMKA

Platí pravidlo, že ak testujete menej ako 10 vzoriek, použite dostatočné množstvo hlavného mixu pre jednu vzorku navyše. Ak testujete 10 alebo viac vzoriek, použite nadbytočný objem hlavného mixu činidiel +10 %.

Tabuľka 4 PCR príprava reakcie hlavnej zmesi

	Objem		
Komponent	**# 1**	**# 5**	**# 10**
Nuclease-Free Water*	16,1 µL	80,5 µL	161,0 µL
Reaction Mix A	5,0 µL	25,0 µL	50,0 µL
Mentype® AMLplex^QS Primer Mix	2,5 µL	12,5 µL	25,0 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	0,4 µL	2,0 µL	4,0 µL
cDNA šablóna alebo kontrolná vzorka*	1,0 µL	5 x 1,0 µL	10 x 1,0 µL
Celkový objem	**25,0 µL**	**125,0 µL**	**250,0 µL**

*Vstup šablóny je možné zvýšiť na 2 µL, na tento účel je potrebné upraviť objem vody bez nukleázy.

Zmiešajte hlavnú zmes jemným vírením a potom zmes krátko odstreďte.

Do pripravených 200 µL PCRskúmaviek alikvotne rozdeľte 24,0 µL PCR master mixu a uzavreté skúmavky krátko odstreďte.

Použitie cDNA šablón a kontrol

Do pripravených PCR skúmaviek obsahujúcich PCR hlavný mix pridajte 1,0 µL nasledujúcich typov vzoriek.

NTC: namiesto vzorky pridajte 1,0 µL Nuclease-Free Water.

cDNAvzorka: pridajte 1,0 µL nezriedenej cDNA vzorky.

PC: namiesto vzorky pridajte 1,0 µL pripraveného roztoku Mentype® AMLplex^QS Positive Contro zriedeného v pomere 1:5.

POZNÁMKA

Najprv pripravte NTC, aby ste zabránili kontaminácii kontroly. Pripravte PC ako poslednú, aby ste zabránili krížovej kontaminácii vzoriek.

POZNÁMKA

Použite aspoň jednu pozitívnu kontrolu PC a jednu kontrolu bez šablóny NTC na jeden cyklus. V opačnom prípade nie je možné cyklus potvrdiť.

Zatvorte všetky PCR skúmavky, jemne ich premiešajte a roztočte.

PCR amplifikácia

Naprogramujte PCR cyklér s nasledujúcim profilom amplifikácie, nezabudnite nastaviť rampu na 4 °C/s. Vykonajte „horúce spustenie" PCR, aby ste aktivovali polymerázu a zabránili vzniku nešpecifických produktov amplifikácie.

POZNÁMKA

Používanie kalibrovaných a dobre udržiavaných PCRcyklov je nevyhnutné, pretože odchýlky môžu negatívne ovplyvniť amplifikáciu citlivých cieľov, ako sú KMT2A::MLLT4.

Tabuľka 5PCR Protokol

Teplota	Čas	
96 °C	4 min (horúci štart na aktiváciu polymerázy)	
96 °C	30 s	
60 °C	120 s	25 cyklov
72 °C	75 s	
68 °C	10 min*	
10 °C	∞	podržte

* Ak sa pozoruje väčšie množstvo mínus-adenínových píkov (-1 bp), je možné predĺženie až na 60 min.

POZNÁMKA

Ak sa používajú tepelné cykléry s nastaviteľnou rýchlosťou ohrevu a chladenia, **nastaví sa nábeh na 4 °C/s**, aby sa zabezpečila optimálna rovnováha súpravy.

POZNÁMKA

Základné informácie o nastavení, programovaní a údržbe rôznych PCR prístrojov nájdete v používateľskej príručke príslušného prístroja.

Kapilárna gélová elektroforéza

Príprava PCR produktov

Po dokončení PCR vyberte vzorky z cykléra a krátko odstreďte.

POZNÁMKA

Po dokončení PCR sa produkty PCR môžu skladovať až 4 týždne pri teplote 2 °C až 8 °C alebo dlhodobo pri teplote -25 °C až -15 °C chránené pred svetlom.

Činidlá rozmrazte, premiešajte a odstreďte:

- Hi-Di™ Formamide(nie je súčasťou súpravy)
- Mentype® AMLplex^QS Allelic Ladder(zelené veko)
- DNA Size Standard BTO (550)(oranžové veko)

Pripravte denaturačnú zmes opísanú v Tabuľka 6 a pridajte jednu alebo dve reakcie na kompenzáciu odchýlok pri pipetovaní. Zahrňte dodatočnú reakciu pre alelický rebríček.

Tabuľka 6 Denaturačná zmes

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

Pipetujte 12,0 µL denaturačnej zmesi do jamiek PCR platne (vhodnej na použitie v Genetic Analyzer).

Do jamiek pridajte 1,0 µL PCRproduktu alebo 1,0 µL Mentype® AMLplex^QS Allelic Ladder. Utesnite PCR platňu vhodnou fóliou, krátko ju premiešajte a odstreďte.

POZNÁMKA

Alelický rebríček sa používa na správne určenie analyzovaných fragmentov počas analýzy údajov. V každom cykle analýzy dĺžky fragmentov sa musí alelický rebríček analyzovať aspoň raz, aby sa zabezpečilo úspešné vyhodnotenie údajov.

POZNÁMKA

Kapiláry zariadenia na gélovú elektroforézu nesmú nikdy vyschnúť. Ak vzorky nezaberú všetky miesta kapiláry, naplňte ďalšie jamky platne s 12,0 µl Hi-Di™ Formamide podľa čísla kapiláry.

Pripravené PCR produkty denaturujte na PCR cykléri 3 minúty pri 95 °C a potom vzorky v cykléri ochlaďte na 4 °C. Pred analýzou dĺžky fragmentov vzorky krátko odstreďte.

Analýza dĺžky fragmentov

Pred vykonaním prvej analýzy dĺžky fragmentov spustite **Matrix Standard BT5 multi** (BIOTYPE GmbH), aby ste vykonali spektrálne zarovnanie použitých fluorescenčných farbív pre Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit (6-FAM™, BTG, BTY, BTO).

POZNÁMKA

Pri inštalácii si pozrite návod na používanie Matrix Standard BT5 multi. Tieto sú k dispozícii na adrese www.biotype.de/en/ifus alebo na požiadanie na support@biotype.de prostredníctvom BIOTYPE GmbH.

Po úspešnom spustení Matrix Standard BT5 multiimportujte poskytnuté nastavenia prístroja pre 3500 Genetic Analyzerpodľa opisu v Tabuľka 7 (www.biotype.de/en/template-files).

Tabuľka 7 poskytnuté súbory pre Genetic Analyzers (www.biotype.de/en/template-files)

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

Špecifikácie požadovaného protokolu prístroja sú opísané v Tabuľka 8 Upravovať by sa mali len opísané parametre, ostatné parametre by mali zostať v predvolenom nastavení. Pri nastavovaní konkrétnych prevádzkových parametrov postupujte podľa návodu na použitie od výrobcu.

Tabuľka 8 Parametre modulov chodu rôznych zariadení na kapilárnu gélovú elektroforézu

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

Odlišne od hodnôt uvedených Tabuľka 8, doba cyklu sa dá nastaviť tak, aby sa analyzovali všetky fragmenty DNA Size Standard 550 (BTO) (60–550 bp).

Pre nastavenie Size Standard protocol nasledujúce veľkosti pre DNA Size Standard 550 (BTO) musia byť priradené oranžovému panelu:

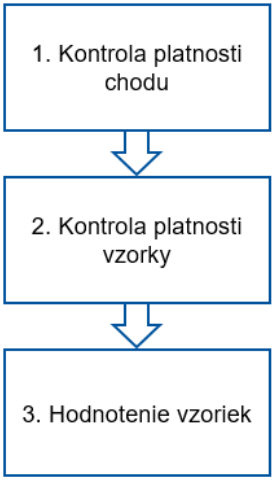
60, **80**, **90**, **100**, **120**, **140**, **160**, **180**, **200**, **220**, **240**, **250**, **260**, **280**, **300**, **320**, **340**, **360**, **380**, **400**, **425**, **450**, **475**, **500**, **525** a **550** bp.

POZNÁMKA

BIOTYPE GmbHposkytuje špecifické šablóny na jednoduchú inštaláciu špecifických nastavení chodu pre analýzu dĺžky fragmentov, ako aj šablóny analýzy na jednoduché nastavenie softvéru GeneMapper™ ID-X. Tieto šablóny sú k dispozícii na stiahnutie prostredníctvom: www.biotype.de/en/template-files.

Analýza údajov

Všeobecný postup analýzy údajov



- Pozri kapitolu **Všeobecné overenie chodu**
- Pozri kapitolu **Analýza vzoriek**
- Pozri kapitolu **Analýza vzoriek**

Všeobecné overenie chodu

1. Platný alelický rebríček
   - Platná DNA Size Standard 550 (BTO) ≥ 50 RFU
   - Platná výška píku ≥ 400 RFU
   - Všetky očakávané výšky sú prítomné

2. Platná pozitívna kontrola PC
   - Platná DNA Size Standard 550 (BTO) ≥ 50 RFU
   - Platná výška píku ≥ 400 RFU
   - Všetky očakávané výšky sú prítomné

3. Platná kontrola bez šablóny NTC
   - Platná DNA Size Standard 550 (BTO) ≥ 50 RFU
   - Neboli zistené žiadne výšky ≥ 400 RFU

POZNÁMKA

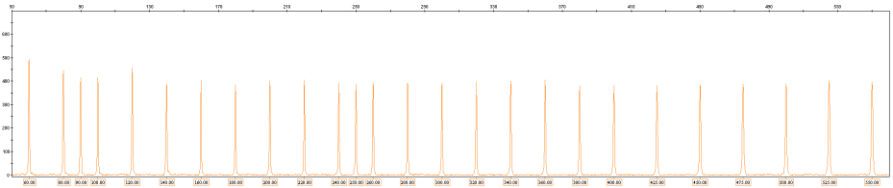
Na posúdenie platnosti by sa mal analyzovať celý rozsah merania od 50 bp do 560 bp.

DNA Size Standard 550 (BTO)

Zistenie presnej dĺžky amplifikovaných produktov závisí od typu zariadenia, podmienok elektroforézy, ako aj použitého štandardu veľkosti DNA. Vzhľadom na zložitosť niektorých cieľov by sa určenie veľkosti malo zakladať na rovnomerne rozložených referenciách.

Na DNA Size Standard 550 (BTO) skontrolujte všetky vzorky podľa týchto kritérií:

- Prítomnosť všetkých fragmentov 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 (pozri Obrázok 1)
- Všetky fragmenty sú prítomné s **≥ 50 RFU**
- Koeficient determinácie **R^2 > 0.995**
  (pozri Size Match Editor z GeneMapper™ ID-X)
- Výška píku fragmentov sa neznižuje kontinuálne s rastúcou dĺžkou fragmentu.



Obrázok 1 Elektroferogram DNA Size Standard 550 (BTO),, fragmenty s dĺžkami v bp

Mentype® AMLplex^QS Allelic Ladder

Po overení platného štandardu veľkosti skontrolujte, či sú všetky píky v alelickom rebríčku prítomné s **≥ 400 RFU**.

POZNÁMKA

Mentype® AMLplex^QS Allelic Ladder obsahuje jeden pík pre každý detekovateľný cieľ. Porovnajte alely s prílohou Obrázok 2.

Mentype® AMLplex^QS Positive Control (PC)

Po zabezpečení platného štandardu veľkosti sa uistite, že všetky špecifické píky pre PC sú prítomné s **≥ 400 RFU**.

Mentype® AMLplex^QS Positive Control, ktorý je súčasťou testovacej súpravy, predstavuje nasledujúce ciele (pozri Tabuľka 9).

Tabuľka 9 Kontrola píkov v Mentype® AMLplex^QS Positive Control

Panel	Kontrolný pík
Modrý	▪ QS-Control ▪ BCR::ABL_b2a3 ▪ RUNX1::RUNX1T1 ▪ ABL-Control
Zelená	▪ KMT2A-PTD_e11e3
Žltý	▪ PML::RARA_bcr3

POZNÁMKA

Mentype® AMLplex^QS Positive Control obsahuje jeden pík pre každý detekovateľný cieľ. Porovnajte alely s prílohou Obrázok 3.

No template control (NTC)

Po zabezpečení platného štandardu veľkosti skontrolujte, či sa v NTC nezistili žiadne píky nad **≥ 400 RFU** (pozri prílohu Obrázok 4).

POZNÁMKA

Použitím GeneMapper ID-X spolu s poskytnutými šablónovými súbormi pre metódu analýzy sa píky < 400 RFU vo vzorkách Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit automaticky nepriraďujú k názvu alely, čo vám pomáha ľahko vyhodnotiť NTC.

POZNÁMKA

Artefakty, ako sú malé farebné škvrny, sa môžu výraznejšie vyskytovať pri NTC. Vzhľadom na širokú základňu píkov, abnormálny tvar píkov a žiadne priradenie píkov je možné odlíšenie od píkov amplikonov.

Analýza vzoriek

Analýza údajov o pracovných postupoch

1. Platná DNA Size Standard 550 (BTO)
   - Pozri kapitolu **DNA Size Standard 550 (BTO)**
2. Platné výšky píku
   - Interné kontroly:
     QS-Control ≥ 400 RFU
     ABL-Control ≥ 400 RFU
   - Cieľová výška píku ≥ 400 RFU, žiadne pull-up píky
3. Hodnovernosť
   - Vhodný počet zistených translokácií: zistené max. 2 špecifické ciele

POZNÁMKA

Ak viacero detekcií cieľa prekročí hraničnú hodnotu alebo ak sa vyskytnú nejaké neistoty, pozrite si časť o riešení problémov (napr. zoznam známych kombinácií signálov) alebo sa obráťte na zákaznícku podporu na support@biotype.de.

Pomocou GeneMapper™ ID-X softwarespolu so špecifickými šablónami, ktoré poskytuje BIOTYPE GmbH, sa základná validácia vykonáva automaticky.

Po kontrole priebehu a platnosti vzorky je potrebné vyhodnotiť údaje vzorky.

POZNÁMKA

Mentype® AMLplex^QS je **výlučne kvalitatívny test**. Táto aplikácia nie je vhodná na kvantifikáciu počtu kópií alebo monitorovanie minimálnej reziduálnej choroby (MRD).

Pri použití hodnotiacich šablón BIOTYPE GmbH a úspešnom vyhodnotení alelického rebríka chodu sa zistené fragmenty PCR automaticky pomenujú. Prehľad dĺžok fragmentov produktov PCR nájdete v nasledujúcej Tabuľka 10.

Tabuľka 10 Prehľad dĺžok fragmentov translokácií v Mentype® AMLplex^QS Allelic Ladder na polymére POP-4™. ‡ Dva amplikóny pre variant KMT2A::MLLT3_6A; * Hoci je tento variant detekovateľný pomocou Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit,, rôzna dĺžka amplikónu (približne 173 bp) bráni automatickému priradeniu

Panel/ Translokácia	Dĺžka [bp]	Panel / Translokácia	Dĺžka [bp]
FAM Panel (Modrý kanál)		**BTG Panel (Zelený kanál)**	
CBFB::MYH11_TypeG	63	DEK::NUP214	78
CBFB::MYH11_TypeI	66	KMT2A-PTD_e9e3	87
QS-Control	72	KMT2A::MLLT3_6A_S‡	113
BCR::ABL_b2a3	107	KMT2A::MLLT3_6B	190
CBFB::MYH11_TypeJ	141	KMT2A-PTD_e10e3	217
CBFB::MYH11_TypeC	146	KMT2A::ELL_e10e3	241
CBFB::MYH11_TypeD	160	KMT2A::MLLT3_7A	245
CBFB::MYH11_TypeH	165	KMT2A::ELL_e10e2	289
CBFB::MYH11_TypeF	175	KMT2A::MLLT4	303
BCR::ABL_b3a3	183	KMT2A-PTD_e11e3	332
BCR::ABL_e1a3	206	KMT2A::MLLT3_8A	359
MLLT10_240::PICALM_2092	265	KMT2A::MLLT3_6A_L‡	497
CBFB::MYH11_TypeA	271	**BTY Panel (Žltý kanál)**	
BCR::ABL_b2a2	282	PML::RARA_bcr1	220
RUNX1::RUNX1T1	301	PML::RARA_bcr3	290
BCR::ABL_b3a2	357	PML::RARA_bcr2*	
CBFB::MYH11_TypeE	366		
MLLT10_240::PICALM_1987	371		

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

Analýza údajov pomocou GeneMapper™ ID-X

Príprava GeneMapper™ ID-X software

Všeobecné pokyny k aplikácii a analýze vzoriek pomocou tohto softvéru nájdete v používateľskej príručke k softvéru GeneMapper™ ID-X Software.

Prideľovanie alel sa vykonáva pomocou analytického softvéru GeneMapper™ ID-Xv kombinácii so súbormi šablón Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kitz BIOTYPE GmbH. Súbory šablón BIOTYPE (pozri Tabuľka 11) sú k dispozícii na našej domovskej stránke (www.biotype.de/en/template-files) na stiahnutie alebo na požiadanie prostredníctvomsupport@biotype.de. Pracovný postup analýzy pomocouGeneMapper™ ID-X softwareje uvedený vTabuľka 12.

Tabuľka 11 BIOTYPE GmbHšablóny pre GeneMapper™ ID-X Software, šablóny špecifické pre [1]POP-1™, [2]POP-4™ and [3]POP-7™ polymer

Šablóna	Názov šablóny	
Panels*	AMLplexIVD_Panel1_v1x[1] AMLplexIVD_Panel4_v1x[2] AMLplexIVD_Panel7_v1x[3]	alebo vyššie verzie
BinSets*	AMLplexIVD_Bins1_v1x[1] AMLplexIVD_Bins4_v1x[2] AMLplexIVD_Bins7_v1x[3]	alebo vyššie verzie
Size Standard*	BTO_60-550_v1x	alebo vyššie verzie
Analysis Method*	AMLplexIVD_Analysis1_v1x[1] AMLplexIVD_Analysis4_v1x[2] AMLplexIVD_Analysis7_v1x[3]	alebo vyššie verzie

Šablóna	Názov šablóny
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes
Table Settings	Table for 2 Alleles
	Table for 10 Alleles

*Tieto šablóny sa musia vždy používať na analýzu údajov. Ostatné súbory šablón sú voliteľné.

POZNÁMKA

Import a volanie alel s poskytnutými súbormi šablón je zaručené len vtedy, ak sa používa GeneMapper™ ID-X software . Pri použití GeneMapper™ software sa môžu vyskytnúť problémy s importom niektorých súborov šablón. Je možné, že budete musieť upraviť Panels a Bins s jedným alebo viacerými spusteniami alelického rebríka na konkrétnom nastavení prístroja. Kontaktujte nás pre podporu (support@biotype.de).

Tabuľka 12 Pracovný postup analýzy údajov s GeneMapper™ ID-X

Č.	Ikona	Pracovný krok
1	Príprava softvéru	
		Panel Manager Importovať poskytnuté súbory šablón pre Panels a Bins
		GeneMapper™ ID-X Manager Importovať poskytnutú šablónu pre Analysis Method a Size Standard
2	Import vzorky	
		Add Samples to Project - vyhľadajte priečinok, vyberte a ***Add to List → Add***
3	Analýza vzoriek	

Č.	Ikona	Pracovný krok
		Vyberte nasledujúce vlastnosti v príslušných stĺpcoch vzorového listu a vyberte ***Analyze.***

Názov stĺpca	Vyberte
Sample Type	Alelický rebríček, pozitívna kontrola, negatívna kontrola alebo vzorka
Analysis Method	Vyberte predtým importované BIOTYPE šablónaAMLplexIVD_Analysis_v1x
Panel	Vyberte predtým importované BIOTYPE template AMLplexIVD_Panel_v1x
Size Standard	Vyberte predtým importované BIOTYPE template BTO_60-550_v1x

4	Kontrola kontroly	
		Kontrola platnosti kontroly (alelický rebríček, pozitívna kontrola, negatívna kontrola) Pri dostatočných výškach píkov sa priradenie vykoná podľa špecifikácií v Analysis Method
5	Hodnotenie vzoriek	
		Skontrolujte platnosť vzorky. Pri dostatočných výškach píkov sa priradenie vykoná podľa špecifikácií v Analysis Method

POZNÁMKA

Pomocou dodaných vzorových súborov pre Analysis Method, Bins, Panels, a výberom príslušného typu vzorky softvér automaticky skontroluje platnosť týchto vzoriek. Príznaky kontroly kvality SOS (Sample off-Scale, SQ (Sizing Quality, OMR (Outside Marker Range majú zelenú farbu, ak je platnosť potvrdená.

POZNÁMKA

Na vyhodnotenie normy veľkosti použite Size Match Editor v GeneMapper™ ID-X. Ak automatické vyvolanie fragmentu zlyhalo, triplety 80 / 90 / 100 bp a 240 / 250 / 260 bp sa môžu použiť na orientáciu pri manuálnom priraďovaní píkov.

Riešenie problémov

Na presnú a spoľahlivú detekciu cieľa by sa mala vykonať následná analýza PCR vrátane automatického priradenia cieľa a validácie pomocou validovaného GeneMapper™ ID-X software v kombinácii so súbormi šablón BIOTYPE. V prípade akýchkoľvek nejasností kontaktujte support@biotype.de.

Pull-up píky

Pull-up píky sa môžu vyskytnúť, ak sú výšky píkov mimo lineárneho detekčného rozsahu alebo ak bola použitá nesprávna matrica. Môžu sa objaviť na pozíciách špecifických píkov v iných farebných paneloch, zvyčajne s nižšou intenzitou signálu. Tento účinok by sa mal zohľadniť v prípadoch vysokých profilov amplifikácie týchto cieľov:

- PML::RARA_bcr3 (žltý kanál) príčiny pull-up píku v KMT2A::ELL_e10e2 (zelený kanál)
- RUNX1::RUNX1T1 (modrý kanál) príčiny pull-up píku v KMT2A::MLLT4 (zelený kanál, len ak je použitý POP-7 ™ Polymer)

Pridávanie nukleotidov nezávisle od šablóny:

Vzhľadom na svoju terminálnu transferázovú aktivitu má Multi Taq 2 DNA Polymerase tendenciu pridávať adenozínový radikál na 3'-koniec amplifikovaných DNAfragmentov. Artefaktový pík je o jednu bázu kratší, ako sa očakávalo (vrchol -1 bp). Všetky primery BIOTYPE sú navrhnuté tak, aby tieto artefakty minimalizovali. Tvorba artefaktov sa ďalej znižuje záverečným krokom voliteľného predĺženia protokolu PCR pri 68 °C počas 60 minút. Výška píku artefaktu koreluje s množstvom cDNA. Laboratóriá by mali definovať svoje individuálne limity pre analýzu píkov.

Artefakty

Izbová teplota môže ovplyvniť výkonnosť produktov PCR na multikapilárnych prístrojoch a môžu sa vyskytnúť ramenné alebo rozdelené píky. Okrem toho by v niektorých prípadoch mohlo byť ovplyvnené automatické prideľovanie. Ak sa tieto účinky vyskytnú, odporúčame vzorku znova vstreknúť pri vyššej izbovej teplote. Vždy zvážte použitie čerstvého spotrebného materiálu podľa odporúčaní výrobcu.

Vplyv polymérov

Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit bolo validované a certifikované na analýzu na POP-4™ polymer. Použitie iných polymérov (ako POP-7™ alebo POP-1™) bolo overené, ale môže ovplyvniť správanie sa konkrétnych produktov PCR počas prevádzky. Okrem toho sa môže zvýšiť šum pozadia v dôsledku odlišného správania sa voľných fluorescenčných farbív.

Odchýlky pri pipetovaní

Analýza odolnosti Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kitukázala, že súprava je odolná voči malým odchýlkam od opísaného protokolu (odchýlka +/- 10 %). Stredná odchýlka (+/- 20 %) od opísaného experimentálneho protokolu môže byť kritickejšia pre analýzu. Je nevyhnutné venovať pozornosť stredným odchýlkam -20 % v zložkách PCR, pretože výrazne znižujú výšku signálu. Najcitlivejšie ciele v tejto súvislosti sú KMT2A::MLLT4 a DEK::NUP214.

Aby ste minimalizovali akékoľvek odchýlky, odporúčame používať kalibrované pipety, presné pipetovanie a dôkladné miešanie.

Nízke píky kontroly ABL

Vnútorná kontrola ABL tvorí najdlhší amplikon Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit, a preto je základným markerom kontroly kvality. V prípade nízkej výšky píku ABL-control je najpravdepodobnejšia jedna z nasledujúcich príčin:

Príliš nízky vstup šablóny do reakcie: určte koncentráciu RNA a podľa potreby zvýšte vstup syntézy cDNA.

Fragmentované RNA, t. j. menšie amplikony z cieľov môžu byť pozitívne, ale vnútorná kontrola ABL chýba. Skontrolujte pracovný postup prípravy vzorky na kontamináciu RNAse. Je známe, že v archivovaných vzorkách dochádza k fragmentácii RNA.

Neúčinná syntéza cDNA: dbajte na dodržiavanie pokynov výrobcu počas syntézy cDNA. Použite jednu z overených súprav na syntézu cDNA podľa opisu v kapitole Transcripcia do cDNA.

Vzorka je ohrozená aktívnym enzýmom reverznej transkriptázy: zabezpečte dodržiavanie pokynov výrobcu s osobitným zreteľom na krok tepelnej aktivácie počas syntézy cDNA.

Ďalšie amplikony alebo dvojité pozitívne výsledky

Očakáva sa, že väčšina vzoriek pacientov bude mať negatívny výsledok alebo pozitívny výsledok pre jednu translokáciu. Viac ako jedna translokácia je nevhodný výsledok a môže si vyžadovať ďalšie overenie. Niektoré kombinácie však boli vo vzorkách pacientov pozorované už skôr, napríklad tieto:

Cieľový BCR::ABL_b2a3 sa môže objaviť s relatívne nízkou výškou píku, ak je silná amplifikácia pre ABL-control alebo akýkoľvek iný variant transkriptu BCR::ABL (približne 5-10 % hlavného cieľového výsledku).

Je známe, že KMT2A partial tandem domain (KMT2A-PTD) sa vyskytuje súčasne s inými translokáciami a v komplexných prestavbách, ktoré môžu byť pozitívne pre viac ako jednu variantu KMT2A-PTD.

Pri použití POP7™-Polymer môže translokácia CBFB::MYH11_Type A viesť k nešpecifickému signálu pre RUNX1::RUNX1T1 a CBFB::MYH11_Type F. Pík RUNX1::RUNX1T1 je pri použití POP4-Polyméru priradený ako vypnutý rebríček a mohol byť overený pomocou bunkovej línie ME-1. Oba nešpecifické bočné píky vykazujú nižšiu výšku RFU píku v porovnaní s CBFB::MYH11_Type A. Pri použití POP7™-Polymer môže byť nešpecifický pík mimo rebríčka priradený ako translokácia CBFB::MYH11_Type I s výškou píku pod 2000 RFU.

Cieľ KMT2A::MLLT4 sa vyskytuje pri dvoch rôznych dĺžkach amplikonov v závislosti od výskytu variantov transkriptu v konkrétnej vzorke. Väčšina vzoriek pacientov vykazuje oba amplikony s rozdielom dĺžky troch

nukleotidov ako dvojitý vrchol v cieľovom koši KMT2A::MLLT4. Toto je platný výsledok, nie sú potrebné žiadne nápravné opatrenia.

Každá KMT2A translokácia sa môže vyskytnúť s bodom zlomu v exóne 9 (najčastejšie) alebo v exóne 10 a 11 (zriedkavo). Akýkoľvek silný pík mimo rebríčka v zelenom kanáli môže pochádzať z atypickej translokácie KMT2A a môže sa overiť inými metódami.

Cieľový KMT2A::MLLT3 variant transkriptu 6A môže v prípade veľmi vysokej vstupnej a veľmi vysokej kvality RNA produkovať dva detegovateľné amplikony, zodpovedajúce píky sú 6A_S (short, povinné) a 6A_L (long, voliteľné). Ide o nevyhnutný jav, ktorý je neoddeliteľnou súčasťou dizajnu priméru Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit. Toto je platný výsledok, nie sú potrebné žiadne nápravné opatrenia.

Pík mimo rebríčka v žltom kanáli medzi binmi PML::RARA_bcr1 a bcr3 je pravdepodobne spôsobený variantom PML::RARA_bcr2. Tento cieľ má niekoľko zlomových bodov v exóne 6 PML, a preto mu nemožno priradiť žiadne špecifické intervaly.

Hodnotenie výkonu

Analytická citlivosť

Typ zvorky pre Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit je definovaný ako cDNA prepisovaný z RNA extrahovanej z periférnej žilovej plnej krvi alebo kostnej drene odobratej ľuďom. Pre vzorky krvi RNA v rozsahu od 50 ng do 1000 ng je merateľný s dostatočnou výškou píku ABL-Control s použitím počas tohto hodnotenia výkonu validovaných cDNA synthesis kits SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Za predpokladu 100 % účinnosti transkripcie to vedie ku koncentrácii cDNA v rozsahu 2,5 ng/µL až 50 ng/µL; v reakcii PCR sa použije 1 µL cDNA. Pre vzorky kostnej drene RNA v rozmedzí od 50 ng do 1000 ng pomocou SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) a od 100 ng do 1000 ng pomocou High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) je merateľná s dostatočnou výškou píku ABL-Control. Za predpokladu 100 % účinnosti transkripcie to vedie ku koncentrácii cDNA v rozsahu 2,5 ng/µL, prípadne 5 ng/µL až 50 ng/µL; v

reakcii PCR sa použije 1 µL cDNA. Optimálny vstup RNA je definovaný ako 1000 ng pre vzorku periférnej plnej krvi a 500 ng pre vzorku kostnej drene. V prípade vzoriek s nízkou koncentráciou RNA alebo kritických cieľov možno vstup cDNA do PCR zvýšiť až na 4 µL pre cDNA prepisované pomocou High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) bez ohľadu na typ vzorky. Pre cDNA prepisované pomocou SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) je vstup cDNA obmedzený na maximálne 2 µL.

Limit of Blank (LoB) bol testovaný na 12 vzorkách s rôznym pôvodom pri vopred definovanom optimálnom vstupnom množstve. Keďže v žiadnej z 12 testovaných vzoriek neboli zistené nešpecifické píky nad prahovou hodnotou 400 RFU v rozsahu 55 bp až 550 bp, možno stanoviť prahovú hodnotu 400 RFU.

Limit of Detection (LoD) Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit sa testovala so 6 umelými vzorkami s cDNA pozadím, pričom sa pokryli všetky páry primerov v zmesi primerov, pričom páry primerov detegujúce viac ako jeden cieľ amplifikovali najdlhší, a teda najťažšie detegovateľný variant cieľového transkriptu.

Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit preukázal prijateľný limit detekcie podľa kritérií akceptovateľnosti s maximálnou LoD 400 kópií pre testované ciele (pozri Tabuľka 13), s výnimkou KMT2A::MLLT4, ktorý stále vykazoval prijateľný výsledok s LoD 1000 kópií. Keďže nebolo možné testovať všetky varianty transkriptov detekovaných génových fúzií, predpokladá sa, že celková hodnota LoD 1000 kópií, ktorá bola najvyšším výsledkom testovaných cieľov, je bezpečne použiteľná.

Tabuľka 13. LoD pre Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit.

Vzorka	Ciele	LoD [kópie]
Vzorka 1	CBFB::MYH11_TypeJ	200
	BCR::ABL_e1a2	200
	CBFB::MYH11_TypeB	200
	KMT2A-PTD_e11e3	200
	PML::RARA_bcr1	400
Vzorka 2	CBFB::MYH11_TypeC	200

Vzorka	Ciele	LoD [kópie]
	CBFB::MYH11_TypeA	100
	NPM1::MLF1	200
	KMT2A::MLLT3_6A_S	100
	KMT2A::MLLT3_6A_L	200
	PML::RARA_bcr3	200
Vzorka 3	CBFB::MYH11_TypeG	200
	BCR::ABL_b2a3	100
	CBFB::MYH11_TypeE	200
	KMT2A::ELL_e10e3	100
Vzorka 4	CBFB::MYH11_TypeI	200
	MLLT10_240::PICALM_2092	200
	RUNX1::RUNX1T1	400
	DEK::NUP214	200
Vzorka 5	KMT2A::MLLT4 (short)	1000
Vzorka 6	KMT2A::MLLT4 (short)	500
	KMT2A::MLLT4 (long)	500

Keďže Mentype® AMLplexQS PCR Amplification Kit je kvalitatívny test určený na stanovenie prítomnosti alebo neprítomnosti cieľového analytu, testovanie Limit of Quantitation (LoQ) sa nepovažuje za relevantné pre zamýšľané použitie.

Analytická špecifickosť

Testovali sme automatické volanie alel pomocou alelického rebríka a zhodu priradenia alely v porovnaní s umelými vzorkami cieľov translokácie pomocou GeneMapper™ ID-X software. Na základe výsledkov sa definujú špecifické nastavenia testovacieho zariadenia pre genotypizáciu pomocou kapilárnej gélovej elektroforézy (bins a panels) Genetic Analyzer.

PCR priméry sú navrhnuté tak, aby sa viazali komplementárne k oficiálnej referenčnej sekvencii DNA ľudského genómu. Genetické varianty, ako napríklad Single Nucleotide Polymorphism (SNPs, INDELs alebo delécie),

môžu ovplyvniť špecifickú väzbu na primér a boli hodnotené podľa záznamov v dbSNP relevantných pre Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit. Jedna položka (rs73504425) vedie k strate funkcie priméru. Variantná alela sa vyskytuje u 0,6 % africkej populácie a nachádza sa vo väzobnom mieste pre PICALM::MLLT10, zriedkavo hlásený fúzny gén s prevalenciou < 1 %.

Okrem toho sa vykonalo vyhľadávanie BLAST v ľudskom transkriptóme pre Mentype® AMLplex^QS Primer mix a neposkytlo žiadne nešpecifické amplifikačné produkty v rozsahu 0 - 600 bp.

Presnosť and pravdivosť

Analytická presnosť Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit je založená na výsledkoch štúdií pravdivosti súpravy. BIOTYPE GmbH sa od roku 2013 aktívne zúčastňuje na programe External Quality Assessment (EQA). Prítomnosť alebo neprítomnosť translokácie vo vzorkách sa určuje na základe konsenzu výsledkov všetkých účastníkov tohto EQA. Od roku 2013 bolo analyzovaných celkovo 68 vzoriek.

Na základe týchto výsledkov bola vytvorená kontingenčná matica na základe porovnania výsledkov Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit (pozitívne/negatívne) a skutočných výsledkov (pozitívne/negatívne), potvrdených konsenzom všetkých účastníkov External Quality Assessment program. Podľa CLSI EP12 (3. vydanie) boli kľúčové ukazovatele výkonnosti uvedené v Tabuľka 14 vypočítané na základe kontingenčnej matice.

Tabuľka 14 Analytické charakteristiky Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit.

Analitické charakteristiky	Odhad	Dolný 95% interval spoľahlivosti	Horný 95% interval spoľahlivosti
Analytická citlivosť	92,2 %	81,5 %	96,9 %
Analytická špecifickosť	94,1 %	73,0 %	99,0 %
Pozitívna prediktívna hodnota	97,9 %	89,1 %	99,6 %
Negatívna prediktívna hodnota	80,0 %	58,4 %	91,9%

Analitické charakteristiky	Odhad	Dolný 95% interval spoľahlivosti	Horný 95% interval spoľahlivosti
Presnosť	92,6 %	83,9 %	96,8 %

Tieto výpočty poskytujú komplexnú mieru schopnosti Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit správne klasifikovať pozitívne a negatívne prípady s 92 %, resp. 94 % pravdepodobnosťou. Celkový podiel správnych výsledkov je 93 %, čo svedčí o vysokej spoľahlivosti. Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit preukazuje vysokú analytickú výkonnosť, čím potvrdzuje účinnosť a spoľahlivosť testu.

Presnosť

Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť testu sme hodnotili na základe normy ISO 5725-2:2022-05 a CLSI EP05 (3. vydanie). Päť umelých vzoriek a Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control sa hodnotilo v rámci viacmiestnej štúdie 5 x 5 x 3 (deň x opakovanie x miesto). Štúdia na viacerých miestach skúma hlavný zdroj odchýlok (opakovateľnosť a reprodukovateľnosť) v dôsledku rôznych testovaných miest, ktoré budú predstavovať rôzne subjekty merajúce na rôznych miestach s použitím rôznych prístrojov. Výsledná opakovateľnosť sa pohybovala v rozmedzí od 8,3 % CV do 15,6 % CV a reprodukovateľnosť od 14,6 % CV do 30,5 % CV. Celkovo Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit vykazuje prijateľnú presnosť s SD_{Rep} ≤ 2500 RFU pre všetky špecifické génové fúzie testované s umelými vzorkami 1 až 5 a pre Mentype® AMLplex^{QS} Positive Control.

Medzná hodnota testu

Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit používa kvalitatívnu detekciu génových fúzií pomocou koncového bodu PCR. Jednou z relevantných medzných hodnôt pre analýzu je minimálna výška píku, ktorá umožňuje bezpečne rozlíšiť technický šum pozadia od skutočnej detekcie cieľa. Medzná výška píku RFU bola stanovená na 400 RFU s údajmi z testovania analytickej citlivosti.

Interferenty a krížové reakcie

Potenciálne interferenty, ktoré by mohli ovplyvniť výsledky postupu merania, boli vyhodnotené v súlade s odporúčaniami CLSI usmernení EP07 (3. vydanie) a EP37 (1. vydanie). Pre Mentype® AMLplex^{QS} PCR Amplification Kit sa určili endogénne a exogénne interferenty, otestovala sa ich maximálna očakávaná koncentrácia (C_{max}) v reakcii PCR, ako sa navrhuje v usmerneniach, a v prípade, že sa pozorovala interferencia, otestovali sa ďalšie koncentrácie, aby sa určila koncentrácia, pri ktorej nie je zistiteľná žiadna interferencia.

Výsledky nepreukázali žiadny rušivý účinok endogénneho interferentu DNA testovaného v množstve 1 ng v reakcii PCR, keď sa rozklad DNA vykonal ako súčasť spracovania vzorky.

Keďže v prípade endogénnej interferentnej krvi bol pozorovaný interferenčný účinok pri vypočítanej hodnote C_{max} 0,87 % v/v v reakcii PCR, testovali sa ďalšie riedenia, až kým sa nezistila žiadna interferencia. 0,087 % v/v krvi nevykazovalo žiadne interferencie. Kontamináciu krvi však možno vizuálne zistiť v reakcii PCR alebo v izolovanej suspenzii RNA na základe oranžového farebného posunu. Ak sa zistí zmena farby, odporúčame izoláciu RNA zopakovať, aby sa predišlo prípadnej interferencii.

V prípade exogénnych interferentov DTT,RNase Inhibitor, DNase, Ethanol, Metoclopramide, EDTA, Hydroxyurea a Citrate sa nepozoroval žiadny interferenčný účinok pri ich príslušných C_{max}, pričom odchýlky od neošetrenej skupiny pozorované pri testovaných vzorkách boli v rámci akceptovaných limitov.

Pokiaľ ide o exogénne interferenty, interferencia reverznej transkriptázy, heparínu a proteinázy K sa pozorovala pri príslušných C_{max} vypočítaných alebo odporúčaných podľa CLSI EP37 (1. vydanie), ďalšie riedenia sa testovali dovtedy, kým sa nezistila žiadna interferencia. V prípade enzýmu reverzná transkriptáza testovaná C_{max} 0,2 % v/v vykazovala interferenciu, pokiaľ enzým nebol tepelne inaktivovaný podľa pokynov výrobcov testovaných súprav na syntézu cDNA. V prípade heparínu 3,3 U/dl a enzýmu Proteináza K 0,0001 % v/v sa nepreukázala žiadna interferencia.

Pomocou odporúčaných izolačných súprav sa dodatočne testovali krvné antikoagulanciá EDTA, citrát sodný a heparín. Nebol zistený žiadny vplyv na

analytický výkon. Očakávame, že pracovný postup izolačných súprav odstráni testované interferujúce látky pochádzajúce z antikoagulantov a činidiel na izoláciu RNA.

Tabuľka 15 Testované neinterferujúce koncentrácie endogénnych a exogénnych interferentov.

Typ interferentu	Kategória	Interferent	Koncentrácia bez rušivých vplyvov
Endogénne	Zložky plnej krvi	Plná krv	0.087 % v/v v PCR reakcii
Exogénne	Antikoagulanciá	EDTA	0,099 mg/dl
		Citrát	0.004 % v/v v PCR reakcii
		Heparín	3,3 U/dL
	RNA izolačné činidlá	Proteinase K	0,0001 % v/v v PCR reakcii
		Etanol	0,3 % v/v v PCR reakcii
		DNase	0,16 % v/v v PCR reakcii
	cDNA činidlá pre reverznú transkripciu	DTT	0,2 % v/v v PCR reakcii
		RNase Inhibitor	0,2 % v/v v PCR reakcii
		Reverzná transkriptáza	0,2 % v/v v PCR reakcii **(inaktivované teplom)**
	Antiemetikum	Metoclopramide	0,225 mg/dl
	Antineoplastická látka	Hydroxyurea	3,08 mg/dl

Stabilita pri používaní

Všetky štúdie stability boli naplánované v súlade s normou ISO 23640:2015 a usmernením CLSI EP25-EP25 (2. vydanie). Pri všetkých štúdiách stability sa postupovalo takto: Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit bola testovaná vo viacerých časových bodoch počas rôzneho trvania. Analyzovali sa umelé vzorky a Mentype® AMLplex^QS Positive Control. Konečné hodnotenie rôznych podmienok zahŕňalo porovnanie priemerov počiatočného časového bodu (T_0) a následných časových bodov (T_n) a vypočítalo sa pomocou nasledujúcej rovnice:

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

V rámci štúdie stability pri používaní sa vykonali dva experimenty. Jeden na testovanie stability po vystavení zmrazovacím a rozmrazovacím cyklom a druhý na testovanie stability súprav počas simulovaného používania po otvorení ako súčasť štúdie stability zmrazovania a rozmrazovania a deklarovanej doby skladovania.

Na základe výsledkov je Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit stabilná až 20 cyklov zmrazovania a rozmrazovania a po otvorení sa môže používať až 24 mesiacov.

Údaje o klinickej výkonnosti

Plán štúdie, etické a regulačné aspekty

Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit a referenčné metódy sa testovali na 297 vzorkách pacientov a 10 zdravých dobrovoľníkov. Cieľom tejto štúdie bolo poskytnúť klinické dôkazy podľa §§ 20 až 24 zákona o zdravotníckych pomôckach "Medizinproduktgesetz„. Pomocou referenčných metód cytogenetických (FISH) a alebo interných validovaných monoplex-qPCR bolo potrebné preukázať zhodu so zariadením. Potvrdenie zodpovednej etickej komisie bolo doručené 06.06.2012.

Referenčné metódy

Hlavným cieľom je stanovenie diagnostickej citlivosti a špecifickosti v porovnaní s referenčnými metódami. Ako referenčná metóda sa vykonala štandardizovaná Fluorescence-In-Situ-Hybridization (FISH) pre vybrané translokácie [Grimwade et al. Blood 116: 354-65, 2010]. Translokácie, ktoré sa nedajú riešiť cytogeneticky, sa testovali pomocou monoplex-nested-PCR-testov zavedených a validovaných v testovacom laboratóriu [Steudel *et al.* Genes Chromosomes Cancer 37: 237-51, 2003, van Dongen *et al.* Leukemia 13: 1901-28, 1999].

RNAextrakcia a čistenie

Mononukleárne bunky (MNC) sa zo vzoriek získali centrifugáciou s gradientom hustoty. Následne sa vykonala izolácia celkovej RNA a reverzná transkripcia do cDNA pomocou komerčne dostupných súprav. Kvalita cDNA sa analyzovala prostredníctvom analýzy v reálnom čase PCR. Na potvrdenie fúznych génov a mutácií slúžili validované jednoduché testy PCR.

Výsledky

Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit nevykazovala žiadne falošne pozitívne výsledky s testovanými cDNA 10 zdravých dobrovoľníkov.

Z 297 testovaných vzoriek pacientov nebolo možné vyhodnotiť 5 vzoriek z dôvodu detekcie internej kontroly ABL pod odporúčanou hranicou. Zo zvyšných 292 vzoriek 201 vykazovalo v porovnaní s referenčnými metódami skutočne negatívne výsledky.

Jednotlivé výsledky porovnávacích testov sú zhrnuté v Tabuľka 16. Fúzie génov PICALM::MLLT10 (CALM-AF10) a KMT2A::MLLT4 (MLL-AF6) nebolo možné vyhodnotiť z hľadiska diagnostickej citlivosti, pretože neboli k dispozícii žiadne pozitívne vopred charakterizované vzorky.

Celkovo sa dosiahla diagnostická citlivosť 94 % a diagnostická špecifickosť 99,5 %.

Tabuľka 16 Záver výsledkov klinickej výkonnosti Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit. *Údaje o výskyte boli citované z Grimwade et al. 2010. n.e. = nehodnotené

Biomarker				Hodnotenie klinického výkonu (n=292)					
Fúzia génov	Chrom. aberácia	Variant	Prev* [%]	Skutočne pozitívne	Skutočne negatívne	Falošne pozitívne	Falošne negatívne	Diagnostická citlivosť [%]	Diagnostická špecifickosť [%]
RUNX1:: RUNX1T1	t(8;21) (q22;q22)	n. b.	7	16	275	0	1	94.1	100.0
BCR::ABL	t(9;22)	e1a3	1	1	291	0	0	100.0	100.0
	(q34;q11)	e1a2							
		b3a2							
		b3a3							
		b2a2							
		b2a3							
PICALM:: MLLT10	t(10;11) (p13;q14)	MLLT10_240-PICALM_1987	1	0	292	0	0	n.e.	100.0
		MLLT10_240-PICALM_2092							
CBFB:: MYH11	inv(16)	Typ A	5	28	262	0	2	93.3	100.0

Biomarker					Hodnotenie klinického výkonu (n=292)				
Fúzia génov	Chrom. aberácia	Variant	Prev* [%]	Skutočne pozitívne	Skutočne negatívne	Falošne pozitívne	Falošne negatívne	Diagnostická citlivosť [%]	Diagnostická špecifickosť [%]
	(p13;q22)	Typ B							
		Typ C							
		Typ D							
		Typ E							
		Typ F							
		Typ G							
		Typ H							
		Typ J							
DEK:: NUP214	t(6;9) (p23;q34)	n. b.	1	3	289	0	0	100.0	100.0
KMT2A:: MLLT4	t(6;11) (q27;q23)	n. b.	< 0,5	0	292	0	0	n.e.	100.0
KMT2A:: MLLT3	t(9;11)	6A (6A_S; 6A_L)	1	4	287	0	1	80.0	100.0
	(p22;q23)	7A							
		8A							
		6B							
KMT2A:: ELL	t(11;19)	e10e2	1	0	290	1	1	0.0	99.7
	(q23;p13.1)	e10e3							
KMT2A-PTD	Čiastočné	e9e3	5-7	23	269	0	0	100.0	100.0
	Tandem	e10e3							
	Duplikácia	e11e3							
NPM1:: MLF1	t(3;5) (q25.1;q34)	n. b.	< 0,5	2	290	0	0	100.0	100.0
PML:: RARA	t(15;17)	bcr1	13	8	284	0	0	100.0	100.0
	(q22;q21)	bcr2							
		bcr3							
Zhrnutie			37	**85**	**201**	**1**	**5**	**94.4**	**99.5**

Diagnostické hodnotenie

Klinické charakteristiky výkonu Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit ukázali prijateľné výsledky. Parametre pre hodnotenie klinického výkonu boli vypočítané podľa prílohy I odd. 9.1b prílohy I k nariadeniu IVDR (EÚ) 2017/746, ako je zobrazené v Tabuľka 17.

Tabuľka 17 Diagnostické charakteristiky Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit

Diagnostické charakteristiky	Odhad	Dolný interval spoľahlivosti	Horný interval spoľahlivosti
Diagnostická citlivosť	94,4 %	87,7 %	97,6 %
Diagnostická špecifickosť	99,5 %	97,3 %	99,9 %
Pozitívna prediktívna hodnota	98,8 %	93,7 %	99,8 %
Negatívna prediktívna hodnota	97,6 %	94,4 %	99,0 %
Diagnostická presnosť	98,0 %	95,6 %	99,1 %

Kontrola kvality

Všetky komponenty súpravy prechádzajú intenzívnym procesom zabezpečenia kvality na BIOTYPE GmbH. Kvalita testovacej súpravy sa neustále monitoruje, aby sa zabezpečila neobmedzená použiteľnosť. Ak máte akékoľvek otázky týkajúce sa zabezpečenia kvality, kontaktujte nás.

Technická pomoc

V prípade potreby technického poradenstva sa obráťte na náš tím zákazníckej podpory:

e-mail: support@biotype.de

telefón: +49 (0)351 8838 400

Referencie

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.

Obmedzenia používania

- Postupy uvedené v tomto návode sa musia dodržiavať podľa opisu. Akékoľvek odchýlky môžu mať za následok zlyhanie testu alebo spôsobiť chybné výsledky.
- Používanie tohto výrobku je obmedzené na profesionálnych používateľov laboratória, ktorí sú špeciálne vyškolení v technikách PCR a kapilárnej gélovej elektroforéze.
- Na optimálne vykonanie tohto testu sú potrebné vhodné postupy odberu, prepravy, skladovania a spracovania vzoriek.
- Tento test sa nesmie použiť priamo na vzorke. Pred použitím tohto testu je potrebné vykonať vhodné metódy extrakcie nukleových kyselín.

- Súprava bola validovaná len na použitie s reagenciami, prístrojmi a softvérom opísanými v kapitole Požadovaný, ale nedodaný materiál a zariadenia
- Mentype® AMLplex^QS bol navrhnutý, validovaný a certifikovaný ako skríningový nástroj na klasifikáciu podtypov AML. Táto aplikácia nie je vhodná na kvantifikáciu počtu kópií, ako je monitorovanie Minimal Residual Disease (MRD) alebo na validáciu iných podtypov leukémií alebo detskej AML.
- Vzhľadom na genetickú variabilitu môžu single nucleotide polymorphism (SNPs) alebo krátke insertion deletion polymorphism (INDELs) ovplyvniť účinnosť priméru alebo dostupnosť templátu. Analýza najnovšej verzie zostavy ľudského genómu (HG38) pre všetky etnické skupiny zistila len jeden kritický SNP, ktorý vedie k strate funkcie priméru. Variantná alela sa vyskytuje u 0,6 % africkej populácie a nachádza sa vo väzobnom mieste pre PICALM::MLLT10, zriedkavo hlásený fúzny gén s prevalenciou < 1 %. Avšak vzhľadom na nízky výskyt génovej fúzie v kombinácii s nízkou pravdepodobnosťou výskytu SNP vo svetovej populácii je riziko falošne negatívnych výsledkov nízke. V prípade akýchkoľvek nejasností zvážte potvrdenie výsledkov pomocou referenčných metód.
- Na zabezpečenie výkonu súpravy sa vyžaduje správna laboratórna prax.
- Výsledky musí interpretovať vyškolený zdravotnícky pracovník.
- Interpretácia výsledkov musí zohľadňovať možnosť falošne negatívnych a falošne pozitívnych výsledkov.
- Nepoužívajte komponenty s uplynutou dobou použiteľnosti alebo nesprávne uskladnené komponenty

Informácie o objednávaní

Objednávky zasielajte e-mailom na adresu sales@biotype.de.

Produkt	Veľkosť balenia	Objednávacie číslo
Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit	25 reakcií	45-12100-0025
	100 reakcií	45-12100-0100
	400 reakcií	45-12100-0400
Matrix Standard BT5 multi	1 x 25 µL	45-15100-0025
	2 x 25 µL	45-15100-0050

Ochranné známky a odmietnutie zodpovednosti

Mentype® je registrovaná ochranná známka spoločnosti BIOTYPE GmbH.

Ďalšie 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). PCR sa vzťahujú patenty. Držiteľmi patentov sú Hoffmann-La Roche Inc.a F. Hoffmann-La Roche (Roche)

Registrované názvy, ochranné známky atď. použité v tomto dokumente, aj keď nie sú ako také výslovne označené, nemožno považovať za nechránené zákonom.

Mentype® AMLplex^QS PCR Amplification Kit je diagnostická súprava s označením CE podľa európskeho nariadenia o diagnostike in vitro (EÚ) 2017/746.

Tento produkt nemá licenciu Health Canada a nie je povolený ani schválený od FDA.

Nie je k dispozícii vo všetkých krajinách.

© 2025 BIOTYPE GmbH; všetky práva vyhradené.

Vysvetlenie symbolov

	Výrobca
LOT	Kód dávky
Σ <N>	Obsahuje dostatočné množstvo činidiel na testy <N>
	Prečítajte si elektronický návod na použitie (eIFU)
	Dátum spotreby
-25°C -15°C	Teplotný limit
REF	Katalógové číslo
IVD	Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro
	Uchovávajte mimo dosahu slnečného svetla
	Udržujte v suchu
UDI	Unique device identifier

Ďalšie označenie použité v tomto návode na použitie:

	Užitočné tipy
	Pozor, dbajte na dodržiavanie tohto upozornenia!
modro podčiarknutý text	Odkazy vedúce na externý obsah, ako sú domovské stránky, e-mailové adresy
čierno podčiarknutý text	Krížové odkazy v dokumente na jednoduchú navigáciu
odsadené, kurzíva, tučný text	Polia, na ktoré sa má kliknúť v softvéri

Príloha

Zoznam cieľových génov

Gén	Alternatívne názvy	Transcript ID
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 referenčných vzoriek

Na nasledujúcich stranách nájdete príklady elektroferogramov Mentype® AMLplexQS Allelic Ladder (Obrázok 2), Mentype® AMLplexQS Positive Control (PC, Obrázok 3) a kontroly bez šablóny (NTC, Obrázok 4).

Všetky vzorky boli amplifikované na ProFlex cykléri PCRa analyzované na prístroji 3500 Genetic Analyzer, (POP-4, 36 cm sústava) s použitím validovaného parametra cyklu. Analýza údajov bola vykonaná pomocou GeneMapper ID-Xverzia 1.6. Boli použité Bins, Panels a Analysis method podľa Tabuľka 11.

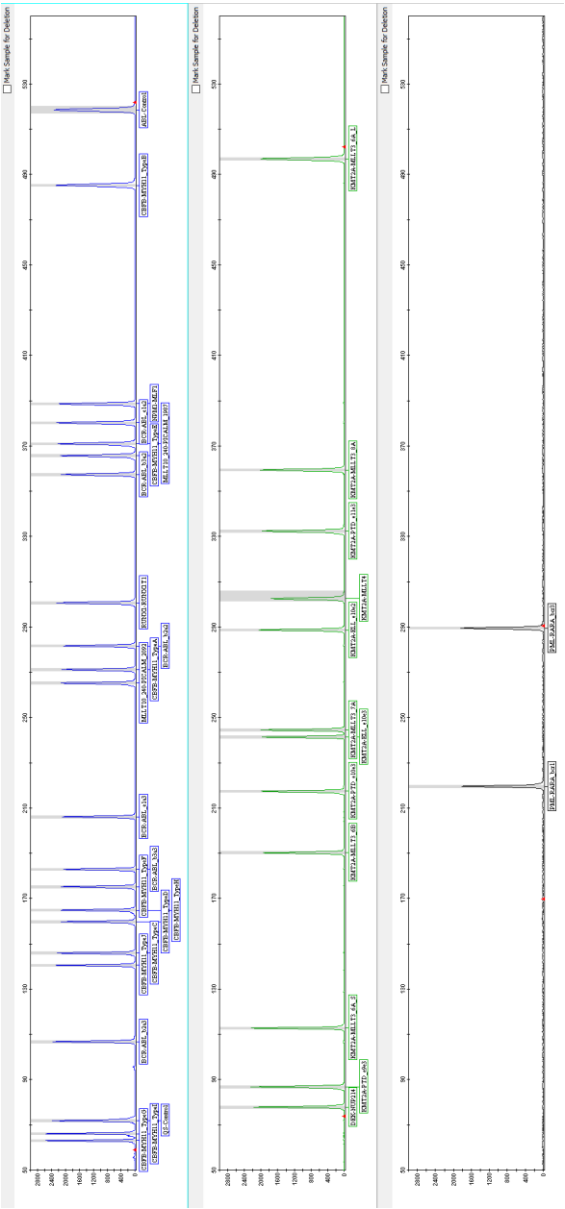
Elektroferogramy sú zväčšené na dĺžku fragmentu 50 - 560 bp (os x). Škálovanie osi y sa vykonalo individuálne:

Obrázok 2, strana 56: Mentype® AMLplexQS Allelic Ladder: 3 000 RFU

Obrázok 3, strana 57: Mentype® AMLplexQS Positive Control: 9 000 RFU

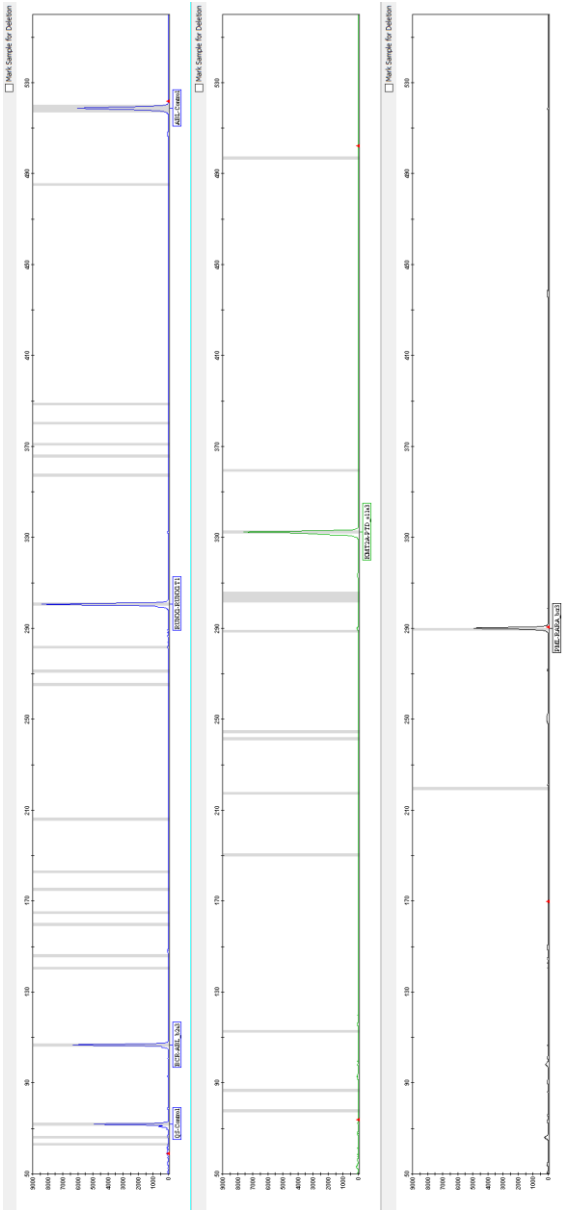
Obrázok 4 , strana 58: Žiadna kontrola šablón NTC 9 000 RFU

Mentype® AMLplex^QS Allelic Ladder



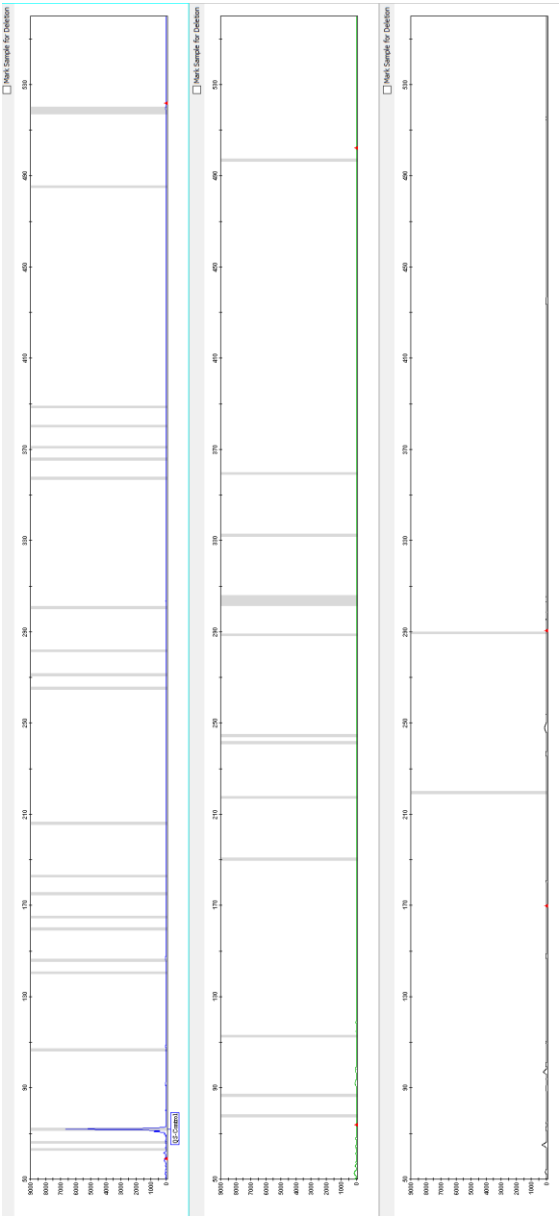
Obrázok 2 Mentype® AMLplex^QS Allelic Ladder

Mentype® AMLplex^QS Positive Control (PC)



Obrázok 3 Mentype® AMLplex^QS Positive Control (PC)

No template control (NTC)



Obrázok 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

Objednávanie
sales@biotype.de

Zákaznícky servis a Podpora
support@biotype.de

BIOTYPE