

Drezno, 2024-10-08

NOTATKA BEZPIECZEŃSTWA (Field Safety Notice, FSN)

dotycząca

wyrobu medycznego do diagnostyki in vitro (IVDD) Mentype® AMLplex^{QS}

Problem: Zmiany instrukcji obsługi związane z bezpieczeństwem

Niezbędne działania naprawcze w zakresie bezpieczeństwa

(Field Safety Corrective Action, FSCA):

Uważnie zapoznaj się z niniejszą notatką

Nadawca:

BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 Drezno
NIEMCY

Adresaci:

Do: Dystrybutorzy, kierownicy laboratoriów i użytkownicy końcowi IVDD Mentype® AMLplex^{QS}

Szanowny kliencie BIOTYPE,

Firma BIOTYPE GmbH podjęła działania naprawcze w zakresie bezpieczeństwa dla wyżej wymienionego produktu. Niniejszy dokument zawiera ważne informacje i wymaga od użytkownika podjęcia natychmiastowych działań.

Identyfikacja produktu, którego to dotyczy:

Imię i nazwisko: Mentype® AMLplex^{QS}

Numer artykułu: 45-31220-0025
45-31220-0100
45-31220-0400

Producent i wewnętrzny numer transakcji:

BIOTYPE GmbH, C_20240916_AML_BT

Opis problemu, jego przyczyny i potencjalnego ryzyka:

W niektórych przypadkach zaobserwowano niespecyficzne szczyty powyżej wartości granicznej. W szczególności próbki z pozytywnym i wysokim wykryciem translokacji CBF::MYH11_Type A wykazały dodatkowe szczyty w pobliżu przedziałów dla

RUNX1::RUNX1T1 oraz, znacznie niższe, dla CFBF::MYH11_Type F. W zależności od specyficznych ustawień instrumentu analitycznego, piki te mogą być przesunięte na przedziały translokacji i dlatego mogą być identyfikowane jako przypisane wartości szczytowe. Wstępne badania wykazały, że te wartości szczytowe występują tylko w próbkach CFBF::MYH11_Type A pozytywnych. W przypadku użycia sztucznego materiału (gBlocks), negatywnych próbek (wildtype) lub próbek pozytywnych dla różnych translokacji, efekty te nie występują.

Problem techniczny:

Przesunięcie obserwowanych wartości szczytowych na przedziałach RUNX1::RUNX1T1 obserwuje się tylko w danych wygenerowanych za pomocą instrumentów Genetic Analyzer wyposażonych w polimer typu POP-7™ lub POP-1™. Jednak CFBF::MYH11_Type F jest również wykrywany przy użyciu polimeru POP-4™, głównie przy wysokiej intensywności sygnału CFBF::MYH11_Type A. Wiadomo, że typy polimerów POP-7™ i POP-1™ mogą wpływać na zachowanie migracyjne fragmentów, a zatem prowadzić do nieco innych długości fragmentów w porównaniu do analizy z POP-4™. Co więcej, te typy polimerów są znane ze zwiększonego szumu tła, potencjalnie prowadzącego do dodatkowych wartości szczytowych powyżej punktu odcięcia analizy (patrz instrukcja obsługi, rozdział 10.2.6 Analiza danych próbki). Elektrofotogramy opisanego efektu, wygenerowane przy użyciu rozcieńczonego cDNA z linii komórkowej ME-1 analizowanego za pomocą POP-4™ i POP-7™ oraz próbki krwi obwodowej pozytywnej dla CFBF::MYH11_Type A, która została przeanalizowana za pomocą POP-1™, znajdują się w Załączniku B.

Dlatego zalecamy stosowanie polimeru typu POP-4™, gdy tylko jest to możliwe.

Ocena ryzyka:

Obserwowany efekt występuje tylko w przypadku próbek CFBF::MYH11_Type A pozytywnych, szczególnie przy wysokich sygnałach wskazujących na wysoką ekspresję tej translokacji.

Zgodnie z literaturą, występowanie więcej niż jednej fuzji genowej w początkowej diagnozie AML jest opisywane jako rzadkie zdarzenie¹. Tylko jeden opis przypadku opisuje diagnozę CFBF::MYH11_Type A i RUNX1::RUNX1T1 równoległe po wstępnej diagnostyce². W jednym dodatkowym opisie przypadku opisano takie wystąpienie z CFBF::MYH11_Type A, nabytym po nawrocie choroby³. Dlatego równoległe występowanie CFBF::MYH11_Type A wraz z RUNX1::RUNX1T1 przy początkowej diagnozie jest bardzo mało prawdopodobnym zdarzeniem.

Jednak korzystanie z opisanych powyżej ustawień urządzenia wiąże się z ryzykiem nieprawidłowej oceny i wyników fałszywie dodatnich, co może prowadzić do niewłaściwych decyzji klinicznych i negatywnie wpływać na leczenie pacjenta. Postępując zgodnie z niniejszą Notatką bezpieczeństwa i wskazówkami dot. rozwiązywania problemów zawartymi w rozdziale 11 instrukcji obsługi, specjalista laboratoryjny zostaje uświadomiony i uczulony, minimalizując w ten sposób ryzyko.

1 Xue Chen et. al, 2020, <https://doi.org/10.1038/s41417-019-0147-1>

2 Inaba T. et. al, 2016, PMID: 30695313

3 Battaglia D. et. al, 1989, PMID: 2758392

Działania naprawcze w zakresie bezpieczeństwa, które powinny zostać podjęte przez użytkownika:

- Jeśli wystąpi opisany efekt, kluczowe jest skupienie się tylko na sygnale fuzji genów o najwyższej intensywności i, jeśli to konieczne, potwierdzenie wyników za pomocą niezależnych metod, takich jak sekwencjonowanie. Z klinicznego punktu widzenia wykrycie więcej niż jednej fuzji genów w pojedynczej próbce pacjenta jest bardzo mało prawdopodobne. Podkreśla to znaczenie krytycznej oceny wszystkich wykrytych sygnałów w celu zapewnienia dokładnej interpretacji wyników, szczególnie w porównaniu z innymi cechami sygnału, takimi jak wewnętrzna kontrola ABL lub najbardziej wyraźna amplifikacja.
- W przypadku pytań lub wątpliwości dotyczących oceny należy zawsze przeczytać rozdział Rozwiązywanie problemów w instrukcji obsługi. W razie dalszych pytań prosimy o kontakt. Aktualną wersję IFU można znaleźć na naszej stronie internetowej (<https://www.biotype.de/en/products/ifus.html>).
- Prosimy o natychmiastowy kontakt z pomocą techniczną poprzez support@biotype.de w przypadku jakichkolwiek niejasności związanych z niniejszą Notatką bezpieczeństwa.
- Aby zapewnić, że wszyscy zainteresowani użytkownicy zostali powiadomieni i zgodnie z obowiązującymi krajowymi przepisami ustawowymi, jesteśmy zobowiązani do dostarczenia dowodu zgłoszenia na rynku właściwym organom krajowym (NCA). W związku z tym prosimy o wypełnienie i podpisanie załączonego formularza potwierdzenia odbioru (Załącznik A) w ciągu **najbliższych 10 dni** i przesłanie go pocztą elektroniczną na adres support@biotype.de lub faksem na numer +49 351 8838 403.

Działania, które zostały przeprowadzone przez producenta:

- Dostosowano instrukcję obsługi (IFU). W szczególności rozdział 11.6 opisuje teraz efekt i dodaną interpretację.
- Dostosowana instrukcja obsługi jest wysyłana wraz z niniejszą Notatką bezpieczeństwa do użytkowników.

Obieg informacji:

Należy się upewnić, że informacje zawarte w niniejszej Notatce bezpieczeństwa zostaną przekazane wszystkim użytkownikom w Państwa organizacji i wszystkim innym osobom, które powinny zostać poinformowane. Prosimy o przesłanie kopii tych informacji w przypadku dostarczenia produktu osobom trzecim lub poinformowanie przedstawiciela naszej firmy, wymienionego poniżej. Prosimy o zachowanie tych informacji do czasu zamknięcia niniejszych działań naprawczych w zakresie bezpieczeństwa. Kopia niniejszej Notatki bezpieczeństwa została wysłana do Niemieckiego Federalnego Instytutu ds. Leków i Wyrobów Medycznych (BfArM - Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte) oraz właściwych organów krajowych w innych krajach, których to dotyczy.

Osoba do kontaktu w BIOTYPE GmbH:

Name: Marie Helbig
Phone number: +49 351 8838 471
E-Mail: m.helbig@biotype.de

Z poważaniem,

Alexandra Pissoke

(Osoba odpowiedzialna za zgodność z przepisami zgodnie z art. 15 (UE) 2017/746)

Załącznik A: Potwierdzenie odbioru

Załącznik B: Elektroforeogramy opisanego efektu

Załącznik A: Potwierdzenie odbioru

Prosimy zwrócić na adres:

BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

Faks: +49 351 8838 403

E-Mail: support@biotype.de

C_20240916_AML_BT

Nadawca:

Nazwa organizacji / firmy:

Osoba do kontaktu:

Adres:

Numer telefonu lub adres e-mail:

Numer klienta, jeśli jest dostępny:

Zaznacz

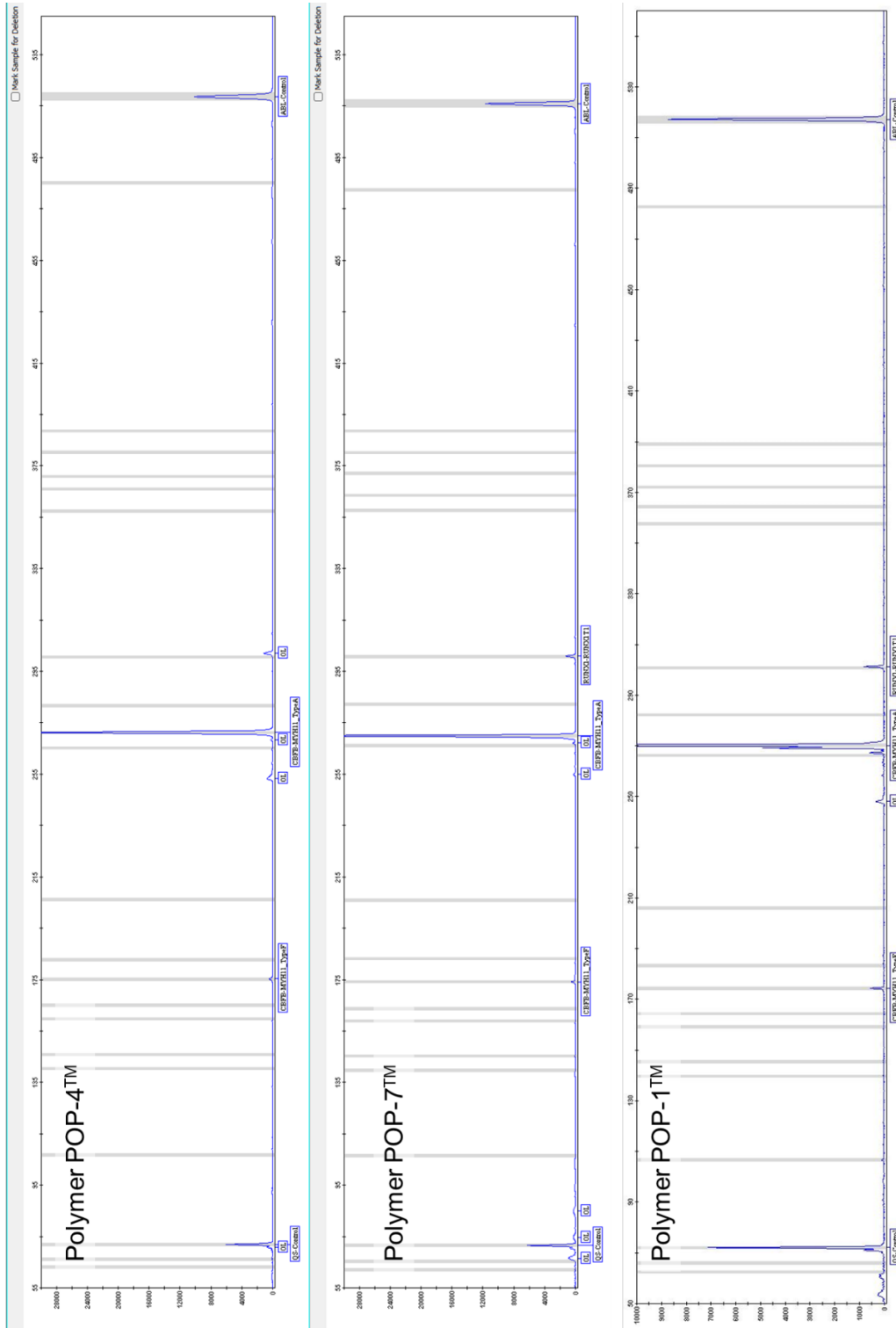
() Potwierdzam otrzymanie niniejszego pisma i oświadczam, że zapoznałem(-am) się z opisanymi skutkami i odpowiednimi zaleceniami dotyczącymi działań.

Tytuł, imię, nazwisko (czytelnie): _____

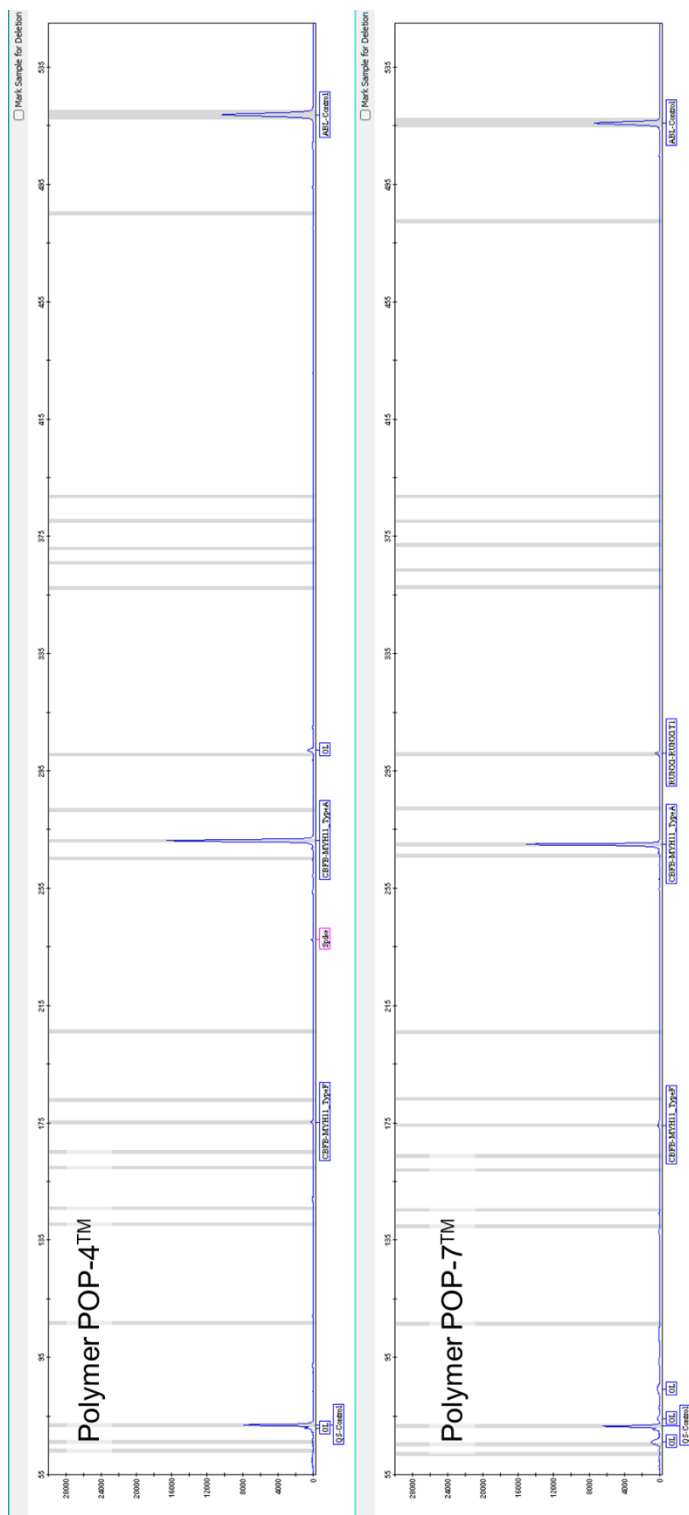
Miejscowość, data, podpis: _____

Załącznik B: Elektrofereogramy opisanego efektu

cDNA z linii komórkowej ME-1 (rozcieńczony w stosunku 1:2), analizowany za pomocą polimeru POP-4™ i POP-7™, pozytywna próbka cDNA z krwi obwodowej analizowana z polimerem POP-1™



cDNA z linii komórkowej ME-1 (rozcieńczone w stosunku 1:5), analizowane za pomocą polimerów POP-4™ i POP-7™





Mentype[®] AMLplex^{QS}

PCR Amplification Kit

Instrukcje użytkowania

Wykrywanie aberracji chromosomalnych
Ostra białaczka szpikowa

Diagnostyka in vitro



AMLIFU01v3pl
Październik 2024 r.



45-31220-0025
45-31220-0100
45-31220-0400



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

Wyprodukowano w Niemczech

AMLIFU01v3pl

BIOTYPE GmbH opracowuje, produkuje i dystrybuje aplikacje oparte na PCR do diagnostyki medycznej.

Nasze zestawy testowe Mentype® gwarantują najwyższe standardy jakości.

Z przyjemnością udzielimy informacji i wysłuchamy Państwa sugestii. Prosimy o kontakt z nami lub odwiedzenie naszej strony www.biotype.de.

Spis treści

1. Użytkowanie zgodne z przeznaczeniem	5
2. Informacje ogólne	5
3. Opis produktu Mentype® AMLplex^{QS}	5
3.1 Instrumenty.....	7
3.2 Typ próbeki.....	7
4. ostrzeżenia i instrukcje bezpieczeństwa	8
4.1 Zapewnienie jakości.....	8
5. Dostarczone materiały	9
5.1 Zawartość zestawu.....	9
5.2 Informacje o zamówieniu.....	9
5.3 Wymagane dodatkowe odczynniki i sprzęt (nie zawarte w zestawie).....	10
6. Przechowywanie	11
7. Przebieg pracy Mentype® AMLplex^{QS}	12
7.1 Przygotowanie próbki i objętość wejściowa cDNA.....	12
7.1.1 Izolacja RNA	12
7.1.2 Transkrypcja RNA do cDNA	12
7.1.3 Użycie szablony cDNA	12
7.2 Przygotowanie mieszaniny wzorcowej.....	13
7.2.1 Kontrola pozytywna	13
7.2.2 Kontrola negatywna	14
7.3 Objętość reakcji.....	15
8. Program PCR i amplifikacja	15
9. Elektroforeza kapilarna w żelu	16
9.1 Przygotowanie produktów PCR.....	16
9.2 Analiza długości fragmentów.....	16
10. Analiza danych	17
10.1 Oprogramowanie i szablony oceny.....	17
10.2 Procedura analizy danych.....	19
10.2.1 Ogólne minimalne wymagania dotyczące analizy danych	19
10.2.2 Testowanie standardu długości DNA Size Standard 550 (BTO)	19
10.2.3 Testowanie drabiny allelicznej/Allelic Ladder	19
10.2.4 Testowanie Mentype® AMLplex^{QS} Control cDNA Kasumi 1	22
10.2.5 Sprawdzanie kontroli negatywnej	22
10.2.6 Analiza przykładowych danych	23
11. Troubleshooting	25
11.1 Limit detekcji.....	25
11.2 Prześwietlenie (Pull-up Peaks).....	25
11.3 Przyłączanie nukleotydów niezależne od szablony.....	25
11.4 Artefakty.....	25

11.5 Wpływ rodzaju polimeru	26
11.6 Niespecyficzne amplikony	26
12. Informacje o zamówieniu	27
13. Referencje	28
14. Znaki towarowe i wyłączenie odpowiedzialności.....	29
15. Symbole	30
Weryfikacja i walidacja Mentype® AMLplex^{QS} Zestawy do amplifikacji PCR	31
A Walidacja analityczna	31
A a) Definicja standardowej reakcji i tolerancji specyficznych dla partii	31
A b) Testowanie dokładności pomiaru	31
A c) Testowanie specyficzności analitycznej	32
A c) a) Testowanie specyficzności analitycznej przy użyciu negatywnych wstępnie typowanych cDNA	32
A c) b) Testowanie specyficzności analitycznej przy użyciu pozytywnego wstępnie typowanego cDNA	32
A d) Testowanie czułości analitycznej	33
A e) Testowanie różnych termocyklorów PCR	33
A f) Testowanie wpływu różnych temperatur wyżarzania w PCR	33
A g) Testowanie różnych partii buforów PCR	34
A h) Okres trwałości po otwarciu	34
B Dane dotyczące wydajności klinicznej	35
B a) Pobieranie próbek, aspekty etyczne i regulacyjne	35
B b) Testy porównawcze	35
B c) Ekstrakcja i oczyszczanie DNA	35
B d) Wyniki	35
B e) Literatura na temat biomarkerów i ich sekwencji DNA	37

Mentype[®] AMLplex^{QS}

1. Użytkowanie zgodne z przeznaczeniem

Zestaw Mentype[®] AMLplex^{QS} jest przeznaczony do jakościowego wykrywania 34 wariantów transkryptu genów, które mogą występować w niektórych podtypach ostrej białaczki szpikowej (AML) w wyniku translokacji chromosomalnych (mutacji somatycznych) obejmujących 11 różnych fuzji genowych.

Aplikacje Mentype[®] AMLplex^{QS} są przeznaczone wyłącznie do użytku profesjonalnego w specjalistycznych laboratoriach. Personel powinien zostać przeszkolony w zakresie technik PCR i stosowania diagnostyki in vitro.

2. Informacje ogólne

Wykrywanie specyficznych aberracji chromosomowych ma ogromne znaczenie prognostyczne i dlatego jest niezbędne w diagnostyce ostrych białaczek. Identyfikacja specyficznych translokacji genetycznych umożliwia klasyfikację podtypów białaczki, a tym samym wspiera terapię pacjentów dostosowaną do ryzyka.

Zestaw Mentype[®] AMLplex^{QS} umożliwia dokładną identyfikację istotnych dla terapii aberracji chromosomalnych leżących u podstaw ostrej białaczki szpikowej (AML), którą można łatwo przeprowadzić w rutynowej diagnostyce.

3. Opis produktu Mentype[®] AMLplex^{QS}

Mentype[®] AMLplex^{QS} Identyfikuje w podejściu wieloparametrowym 34 warianty transkryptu następujących genów fuzyjnych: RUNX1::RUNX1T1, BCR::ABL, PICALM::MLLT10, CBFβ::MYH11, DEK::NUP214, KMT2A::MLLT4, KMT2A::MLLT3, KMT2A::ELL, KMT2A-PTD, NPM1::MLF1 i PML::RARA (por. Tabela 1).

Wyniki Mentype[®] AMLplex^{QS} są zabezpieczone przez dwie kontrole wewnętrzne. Wewnętrzna kontrola PCR (Quality Sensor "QS-Control") pokazuje powodzenie reakcji amplifikacji; "kontrola cDNA" (ABL-Control) jest dołączona do zestawu, aby pokazać jakość użytego cDNA.

Test ten polega na analizie długości fragmentów przy użyciu elektroforezy żelowej w kapilarze. Startery są oznaczane barwnikami fluorescencyjnymi **6-FAM**, **BTG** lub **BTY**.

Tabela1 Fuzje genów i warianty transkryptów, które można wykryć za pomocą Mentype® **AMLplex**^{QS}

Fuzja genów	Aberracja chromosomalna	Wariant
RUNX1::RUNX1T1 (AML1-ETO)	t(8;21) (q22;q22)	-
BCR::ABL	t(9;22) (q34;q11)	e1a3 e1a2 b3a2 b3a3 b2a2 b2a3
PICALM::MLLT10 (CALM-AF10)	t(10;11) (p13;q14)	MLLT10_240-PICALM_1987 MLLT10_240-PICALM_2092
CBFB::MYH11	inv(16) (p13;q22)	Type A Type B Type C Type D Type E Type F Type G Type H Type I Type J
DEK::NUP214 (DEK-CAN)	t(6;9) (p23;q34)	-
KMT2A::MLLT4 (MLL-AF6)	t(6;11) (q27;q23)	-
KMT2A::MLLT3 (MLL-AF9)	t(9;11) (p22;q23)	6A_(THP-1) 7A_(10A) 8A_(MM6) 6B_(9B)
KMT2A::ELL (MLL-ELL)	t(11;19) (q23;p13.1)	e10e2 e10e3
KMT2A-PTD (MLL-PTD)	Partial Tandem Duplication	e9e3 e10e3 e11e3
NPM1::MLF1	t(3;5) (q25.1;q34)	-
PML::RARA	t(15;17) (q22;q21)	bcr1 (PR-L) bcr2 (PR-V) bcr3 (PR-S)

3.1 Instrumenty

Zestawy Mentype® **AMLplex^{QS}** zostały sprawdzone i zwalidowane na następujących termocyklarach PCR:

- GeneAmp™ 9700 Silver Thermocycler (Applied Biosystems™)
- Eppendorf Mastercycler ep-S (Eppendorf AG)
- Biometra T1 (Analytik Jena AG)
- Proflex PCR System (Applied Biosystems™)

Zestawy zostały zweryfikowane i zwalidowane w następujących systemach elektroforezy kapilarnej z użyciem POP-4™ (Applied Biosystems™) i kapilary o długości 36cm POP-7™ / POP-1™:

- ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™)
- ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™)
- ABI PRISM® 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™)
- SeqStudio™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems™)

Analiza danych została zweryfikowana przy użyciu następujących wersji oprogramowania:

- GeneMapper™ ID 3.2 (Applied Biosystems™)
- GeneMapper™ ID-X 1.4 (Applied Biosystems™)

Korzystanie z zestawów Mentype® **AMLplex^{QS}** na urządzeniach lub z oprogramowaniem innym niż wymienione powyżej musi zostać zatwierdzone i zweryfikowane przez użytkownika na jego własną odpowiedzialność.

3.2 Typ próbki

Mentype® **AMLplex^{QS}** zostały zweryfikowane za pomocą cDNA transkrybowanego z RNA wyizolowanego z krwi pełnej na cytrynianie.

Produkt Mentype® **AMLplex^{QS}** jest zatwierdzony do użytku 1 µL cDNA, który jest transkrybowany z 1 µg RNA w objętości reakcji 20µL. Użycie większych ilości cDNA musi zostać zatwierdzone przez użytkownika.

4. ostrzeżenia i instrukcje bezpieczeństwa

Prosimy o zapoznanie się z kartami charakterystyki (SDS) produktów BIOTYPE, które z przyjemnością prześlemy na żądanie (support@biotype.de). Aby uzyskać karty charakterystyki odczynników, które nie są zawarte w zestawie testowym, należy skontaktować się z odpowiednim producentem.

Przed użyciem produktu należy uważnie przeczytać instrukcję obsługi.

Po otrzymaniu należy sprawdzić produkt i jego składniki pod kątem kompletności pod względem ilości, typu i napełnienia (patrz rozdział 5.1, Zawartość zestawu), prawidłowego oznakowania, stanu zamrożenia odczynników i integralności opakowania odczynników.

Podczas korzystania z testów należy nosić rękawiczki, fartuch laboratoryjny i okulary ochronne.

Unikać zanieczyszczenia próbek nukleazą (DNA-za / RNA-za), stosując wolne od DNA-zy / RNA-zy jednorazowe końcówki do pipet z filtrami pochłaniającymi aerozol.

Używać oddzielnych obszarów roboczych do przygotowywania próbek (przed PCR), przygotowywania mieszanin wzorcowych oraz przetwarzania i analizy próbek (po PCR). Kontrole pozytywne należy przechowywać oddzielnie od składników zestawu.

Dodatkowe kontrole mogą być konieczne zgodnie z wytycznymi lub wymogami lokalnych, krajowych i/lub federalnych przepisów lub organizacji akredytacyjnych.

Nie używać składników zestawu, których data ważności została przekroczona i nie mieszać składników zestawu pomiędzy różnymi partiami.

Usunąć próbkę i odpady testowe zgodnie z lokalnymi przepisami bezpieczeństwa.

4.1 Zapewnienie jakości

Cała zawartość zestawu testowego jest poddawana intensywnej kontroli jakości przez BIOTYPE GmbH. Jakość zestawów testowych jest stale sprawdzana w celu udowodnienia ich nieograniczonej użyteczności. Prosimy o kontakt pod adresem e-mail support@biotype.de w przypadku wszelkich pytań dotyczących zapewnienia jakości.

5. Dostarczone materiały

5.1 Zawartość zestawu

Zestawy Mentype® **AMLplex^{QS}** zawierają następujące składniki wystarczające do przeprowadzenia 25, 100 lub 400 reakcji.

Tabela 2 Rozmiary opakowań i komponenty zawarte w zestawach Mentype® **AMLplex^{QS}**

Składnik zestawu	Odczynnik	Objętość na rozmiar opakowania		
		25 reakcji	100 reakcji	400 reakcji
Nuclease-Free Water	Woda wolna od nukleaz	1,5 ml	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Mieszanina reakcyjna A	125 µL	500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix	Mieszanina starterów	63 µL	250 µL	4 x 250 µL
Multi Taq2 DNA Polymerase	Polimeraza DNA	10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® AMLplex^{QS} Control cDNA Kasumi 1	Kontrolny cDNA	10 µL	10 µL	10 µL
Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder	Drabina alleliczna	25 µL	25 µL	4 x 25 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Standard wielkości	13 µL	50 µL	200 µL

Nie wolno mieszać składników zestawu pochodzących z różnych partii. Przegląd numerów partii można znaleźć na etykiecie po wewnętrznej stronie pokrywy pudełka. Pobieranie składników zestawu do innych naczyń reakcyjnych jest niedozwolone.

5.2 Informacje o zamówieniu

Prosimy o przesłanie pisemnego zamówienia pocztą elektroniczną na adres sales@biotype.de. Zamówienie musi zawierać numery zamówień zgodnie z Tabela 3 i Tabela 15, strona 27.

Uwaga: Należy pamiętać, że opakowanie w wielkości dla 10 reakcji nie jest już sprzedawane.

Tabela 3 Numery porządkowe zestawów Mentype® **AMLplex^{QS}**

Produkt	Wielkość opakowania	Nr zamówienia
Mentype® AMLplex^{QS}	25 reakcji	45-31220-0025
Mentype® AMLplex^{QS}	100 reakcji	45-31220-0100
Mentype® AMLplex^{QS}	400 reakcji	45-31220-0400

5.3 Wymagane dodatkowe odczynniki i sprzęt (nie zawarte w zestawie)

W celu wstępnej kalibracji urządzenia do elektroforezy kapilarnej w żelu do określonych barwników fluorescencyjnych z zestawu Mentype® **AMLplex^{QS}**, należy przeprowadzić kalibrację spektralną przy użyciu następującego odczynnika z BIOTYPE GmbH (Tabela 4):

Tabela 4 Dodatkowe odczynniki wymagane dla BIOTYPE GmbH

Odczynnik	Zastosowanie	Wielkość opakowania	Nr zamówienia
Matrix Standard BT5 multi	Kalibracja spektralna systemu elektroforezy kapilarnej w żelu (kilka kapilar)	25 µL.	00-10421-0025
Matrix Standard BT5 multi	Kalibracja spektralna systemu elektroforezy kapilarnej w żelu (kilka kapilar)	2 x 25 µL.	00-10421-0050

Do wykonania zestawu wymagane są następujące ogólne materiały i przyrządy:

- Wirówka stacjonarna z jednym rotorem dla naczyń reakcyjnych o pojemności 2 ml
- 96-dołkowe płytki reakcyjne lub probówki reakcyjne o pojemności 0,2 ml, odpowiednie pokryvky lub folie w przypadku korzystania z 96-dołkowych płytek reakcyjnych, wirówka z rotorem do płytek mikrolitrowych
- Mieszadło Vortex, odpowiednie dla 96-dołkowych płytek reakcyjnych lub probówek reakcyjnych 0,2 ml
- Pipety, końcówki do pipet z filtrami (jednorazowe)
- Bezpydrowe rękawice jednorazowe
- Odpowiedni zestaw do izolacji RNA (por. rozdział 7.1.1, **Izolacja RNA**)
- Odpowiedni przyrząd do ilościowego pomiaru stężenia RNA po izolacji i oczyszczeniu (por. 7.1.1, **Izolacja RNA**)
- Odpowiedni zestaw do transkrypcji RNA na cDNA (por. 7.1.2, Transkrypcja RNA do cDNA)
- Blok lodowy do krótkotrwałego przechowywania polimerazy
- Odpowiedni cykl PCR (por. rozdział 3.1, InstrumentyInstrumente)
- Hi-Di™ Formamidy (Applied Biosystems™)
- Odczynniki i materiały eksploatacyjne systemu elektroforezy kapilarnej w żelu
- Odpowiednie urządzenie do elektroforezy kapilarnej w żelu (por. rozdział 3.1, InstrumentyInstrumente)

Uwaga: Upewnić się, że wszystkie urządzenia są zainstalowane, konserwowane i kalibrowane zgodnie ze specyfikacjami producenta. Upewnić się, że dostępne są wszystkie odczynniki do obsługi odpowiedniego urządzenia do PCR i elektroforezy kapilarnej w żelu (patrz instrukcja obsługi odpowiedniego producenta urządzenia).

6. Przechowywanie

Zestawy Mentype® **AMLplex^{QS}** są wysyłane w suchym lodzie. Składniki zestawu są dostarczane w stanie zamrożonym. Jeśli jeden lub więcej komponentów nie jest zamrożonych po otrzymaniu lub jeśli próbki zostały uszkodzone podczas transportu, prosimy o kontakt BIOTYPE GmbH (support@biotype.de), w celu uzyskania dalszej pomocy.

Komponenty muszą być przechowywane w temperaturze od -25 °C do -15 °C. Kontrolne cDNA i odczynniki post-PCR (Allelic Ladder i DNA Size Standard) powinny być przechowywane oddzielnie od odczynników PCR.

Należy unikać częstego rozmrażania i zamrażania. Nie wolno przekraczać maksymalnej liczby 20 cykli zamrażania na zimno.

Zestawy Mentype® **AMLplex^{QS}** należy przechowywać z dala od światła.

Okres przechowywania zestawu testowego jest podany na etykiecie opakowania.

7. Przebieg pracy Mentype® AMLplex^{QS}

7.1 Przygotowanie próbki i objętość wejściowa cDNA

7.1.1 Izolacja RNA

Jakość wyizolowanego RNA ma decydujący wpływ na wydajność i jakość całego systemu testowego. Należy upewnić się, że system używany do izolacji RNA jest kompatybilny z technologią PCR.

Następujące zestawy zostały przetestowane pod kątem izolacji RNA i są odpowiednie do użycia:

- RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE)
- RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE)

Użycie alternatywnych zestawów do izolacji RNA musi zostać zatwierdzone przez użytkownika na jego własną odpowiedzialność.

Uwaga: W celu uzyskania dokładnych wyników wymagana jest kwantyfikacja RNA (np. poprzez spektroskopową kwantyfikację RNA UV/VIS przy A260 nm i określenie jakości przy użyciu stosunku A260 / A280, który powinien wynosić od 1,7 do 2,0).

7.1.2 Transkrypcja RNA do cDNA

Po wyizolowaniu i oznaczeniu ilościowym RNA, jest on transkrybowany do cDNA przy użyciu dostępnych na rynku zestawów. Zatwierdzono wsad RNA o masie 1 µg w mieszaninie reakcyjnej 20 µL reakcji transkrypcji.

Poniższe zestawy zostały przetestowane pod kątem transkrypcji i nadają się do użytku:

- High Capacity cDNA Transcription Kit (Applied Biosystems™)
- QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE)

Korzystanie z alternatywnych zestawów do przepisywania musi zostać zatwierdzone przez użytkownika na jego własną odpowiedzialność.

7.1.3 Użycie szablону cDNA

Zestaw Mentype® AMLplex^{QS} został zoptymalizowany do użycia 1 µL cDNA (nierozcieńczonego), który został przygotowany zgodnie z opisem w punkcie 7.1.2.

Ilość matrycy cDNA można zwiększyć w przypadku krytycznych próbek pacjentów. Należy użyć maksymalnie 1/10 objętości reakcji RT. W przygotowaniu reakcji zestawu Mentype® AMLplex^{QS} należy skorygować objętość wody wolnej od nukleaz, tak aby

całkowita objętość preparatu PCR wynosiła zawsze 25 µL. Procedura ta musi zostać zatwierdzona przez użytkownika na jego własną odpowiedzialność.

7.2 Przygotowanie mieszaniny wzorcowej

Wszystkie odczynniki należy dobrze wymieszać (worteksować) i krótko odwirować (ok. 10 s) przed przygotowaniem mieszaniny wzorcowej. Przechowywać Multi Taq2 DNA Polymerase na bloku lodu podczas przenoszenia.

Całkowita objętość preparatu PCR musi zawsze wynosić 25 µL.

Przy obliczaniu liczby reakcji PCR należy wziąć pod uwagę kontrole pozytywne i negatywne. Dodaj jedną lub dwie reakcje do całkowitej liczby, aby zrekompensować błędy pipetowania.

Poniższy przegląd przedstawia objętości składników zestawu używanych przy objętości próbki 1,0 µL (matryca cDNA) i objętości reakcji 25µL.

Tabela 5 Zastosowanie mieszaniny wzorcowej dla reakcji Mentype® **AMLplex**^{QS} z użyciem 1 µL cDNA

Komponent	Objętość na preparat PCR
Nuclease-Free Water	16,1 µL
Reaction Mix A*	5,0 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Całkowita objętość mieszaniny wzorcowej	24,0 µL
Szablon cDNA	1,0 µL

* zawiera Mg²⁺, dNTPs, BSA

7.2.1 Kontrola pozytywna

Najpierw rozcieńczyć kontrolę pozytywną Control cDNA Kasumi 1 zawartą w zestawie wodą wolną od nukleazy do 250 ng/µL (1:2, np. 1µL kontrolnego cDNA Kasumi 1 + 1 µL wody wolnej od nukleazy).

W przypadku kontroli pozytywnej należy użyć 1 µL rozcieńczonej kontroli pozytywnej Control cDNA Kasumi 1 zamiast matrycowego cDNA. Odmierzyć pipetą kontrolne cDNA zamiast matrycowego cDNA do próbek reakcyjnych zawierających mieszaninę wzorcową PCR.

Poniższy przegląd przedstawia objętości składników zestawu użytych z 1 µL kontrolnego cDNA i objętością reakcji 25 µL.

Tabela 6 Zastosowanie mieszaniny wzorcowej dla reakcji Mentype® **AMLplex**^{QS} z użyciem 1 µL pozytywnej próbki kontrolnej

Komponent	Objętość na preparat PCR
Nuclease-Free Water	16,1 µL
Reaction Mix A*	5,0 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Całkowita objętość mieszaniny wzorcowej	24,0 µL
Rozcieńczony Mentype® AMLplex ^{QS} Kontrolny cDNA Kasumi 1	1,0 µL

* zawiera Mg²⁺, dNTPs, BSA

7.2.2 Kontrola negatywna

Jako kontrolę negatywną (bez kontroli matrycy), do próbek reakcyjnych zawierających mieszaninę wzorcową PCR należy dodać pipetą 1 µL wody wolnej od nukleaz zamiast matrycy cDNA.

Poniższy przegląd przedstawia objętości składników zestawu użytych z 1 µL „Wody wolnej od nukleaz” i objętością reakcji 25 µL.

Tabela 7 Zastosowanie mieszaniny wzorcowej kontroli negatywnej dla reakcji Mentype® **AMLplex**^{QS}

Komponent	Objętość na preparat PCR
Nuclease-Free Water	16,1 µL
Reaction Mix A*	5,0 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Całkowita objętość mieszaniny wzorcowej	24,0 µL
Woda wolna od nukleazy w kontroli negatywnej	1,0 µL

* zawiera Mg²⁺, dNTPs, BSA

Ponadto, jako negatywną próbkę kontrolną można dołączyć już znany cDNA, który jest negatywny dla wykrywalnych fuzji genów i translokacji. Musi ona zostać przetworzona jak normalna próbka i użyta w PCR jako dodatkowa reakcja.

7.3 Objętość reakcji

Odmierzyć pipetą 24µL wzorcowej mieszaniny PCR do probówek reakcyjnych lub na płytkę wielodołkową. Następnie dodać 1 µL cDNA lub 1µL kontroli pozytywnej lub negatywnej.

Po pipetowaniu naczynia reakcyjne lub płytki wielodołkowe muszą być szczelnie zamknięte. Krótco wymieszać i odwirować mieszaniny reakcyjne, a następnie przenieść je do cyklera PCR w celu amplifikacji.

8. Program PCR i amplifikacja

W celu aktywacji Multi Taq 2 DNA Polymerase i powstrzymania powstawania niespecyficznych produktów amplifikacji stosuje się „**gorący start**”.

Aby określić optymalną liczbę wymaganych cykli PCR, wewnętrzna kontrola ABL może być użyta jako odniesienie. W rezultacie wysokość pików nie powinna przekraczać określonego zakresu pomiarowego urządzenia (np. 500 do 5 000 RFU w ABI3130).

Jeśli stężenie cDNA jest zbyt niskie, mogą wystąpić statystyczne spadki (spadki alleli) i niezrównoważone wysokości pików. Prawdopodobieństwo wystąpienia niespecyficznych produktów amplifikacji wzrasta wraz z liczbą cykli.

Uwaga: Aby uzyskać optymalną równowagę zestawu, szybkość ogrzewania i chłodzenia urządzeń PCR powinna być ustawiona na 4°C/s.

Tabela 8 Parametry amplifikacji PCR dla realizacji Mentype® AMLplex^{QS}

Temperatura	Czas	Liczba cykli
96 °C	4 min	1 x (gorący start do aktywacji polimerazy DNA Multi Taq2)
96 °C	30 s	
61 °C	120 s	22-28 x
72 °C	75 s	
68 °C	10 min*	1 x
10 °C	∞	hold

*Jeśli wystąpi zwiększony poziom pików -adeninowych (-1 bp), etap ten można wydłużyć do maksymalnie 60 minut.

Liczba cykli zależy od ilości użytego cDNA i poziomu ekspresji wariantu transkryptu, który ma zostać wykryty. Przetestowano cykle o numerach od 22 do 28. W przypadku próbek referencyjnych z materiału hodowli komórkowej (wysokie wskaźniki ekspresji) zalecamy zmniejszenie liczby cykli PCR do 22 cykli. Aby osiągnąć maksymalną czułość (limit wykrywania 11.1 Limit detekcji/Detektionslimit), zalecamy użycie maksymalnej liczby cykli wynoszącej 28 cykli.

9. Elektroforeza kapilarna w żelu

9.1 Przygotowanie produktów PCR

Po zakończeniu reakcji PCR wyjąć próbki z cyklera i krótko odwirować. Rozmrozić odczynniki Hi-Di™ formamidu (nie wchodzi w skład zestawu) i DNA Size Standard 550 (BTO), krótko wymieszać probówki i krótko je odwirować. Przygotować partię opisaną w Tabeli z Hi-Di™ formamidu i kwasu DNA Size Standard 550 (BTO) i dodać jedną lub dwie reakcje do partii, aby skompensować wahania pipetowania.

Tabela 9 Przygotowanie mieszaniny denaturującej

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

Odpipetować 12 µL denaturującej mieszaniny Hi-Di™ formamidu i DNA Size Standard 550 (BTO) do odpowiedniej liczby studzienek płytki PCR (odpowiedniej do użycia w Genetic Analyzer). Następnie dodać 1 µL produktu PCR lub 1 µL Mentype® **AMLplex**^{QS} Allelic Ladderproduktu na studzienkę. Uszczelnić płytkę PCR odpowiednią folią, worteksować i krótko odwirować płytkę. Usunąć folię i uszczelnić płytkę za pomocą przegrody producenta urządzenia.

Uwaga: Drabina alleliczna jest używana do prawidłowego określenia fragmentów analizowanych podczas analizy danych. W każdym przebiegu analizy długości fragmentu, drabina alleliczna musi zostać przeanalizowana co najmniej raz, aby zapewnić pomyślną analizę danych.

Uwaga: Kapilary urządzenia do elektroforezy żelowej nie mogą wyschnąć. Jeśli próbki nie zajmują wszystkich pozycji kapilar, należy wypełnić dodatkowe dołki płytki 12 µL Hi-Di™formamidu zgodnie z liczbą kapilar.

Denaturować przygotowane produkty PCR na cyklerze PCR przez 3minuty w temperaturze 95 °C, schłodzić próbki w cyklerze do temperatury 4 °C. Krótko odwirować próbki przed analizą długości fragmentów.

9.2 Analiza długości fragmentów

Ogólne instrukcje dotyczące analizatora, tworzenia matryc i korzystania z GeneMapper™ Software można znaleźć w odpowiednich instrukcjach *ABI PRISM® Genetic Analyzer User's Manual*.

Po pomyślnym przeprowadzeniu kalibracji spektralnej urządzenia do elektroforezy kapilarnej w żelu z użyciem odczynnika Matrix Standard BT5 (BIOTYPE GmbH) należy utworzyć specjalny moduł przebiegu (ABI 3130, SeqStudio™) lub protokół urządzenia (ABI 3500) z następującymi parametrami:

Tabela 10 Specyficzne parametry przebiegu dla analizy długości fragmentów Mentype® AMLplex^{QS}

	ABI 3500	ABI 3130	SeqStudio™
Injections Voltage [kV]	3.0	3.0	1.2
Injection Time [s]	10	10	10
Run Voltage [kV]	domyślny	15 (36 cm Array) 19.5 (50 cm Array)	9
Run Time [s]	1560	1560	1560

Odbiegając od wartości określonych w Tabeli 10, czas działania można dostosować do analizy wszystkich fragmentów (60-550bp) DNA Size Standard 550 (BTO).

Uwaga: Postępuj zgodnie z instrukcjami producenta urządzenia do elektroforezy kapilarnej w żelu, aby ustawić określone parametry przebiegu.

Uwaga: Należy również zwrócić uwagę na dodatkowe informacje dotyczące kalibracji i stosowania produktów Mentype®- w urządzeniach do elektroforezy kapilarnej w żelu. Są one dostępne na żądanie pod adresem support@biotype.de wBIOTYPE GmbH.

10. Analiza danych

10.1 Oprogramowanie i szablony oceny

Dane są analizowane przy użyciu oprogramowania GeneMapper™ ID lub GeneMapper™ ID-X (Applied Biosystems™).

Do prostej oceny danych firma BIOTYPE GmbH oferuje na stronie www.biotype.de wstępnie przygotowane ustawienia (Tabela 11), które można zaimportować do odpowiedniej wersji GeneMapper™ i zastąpić ręczne tworzenie parametrów analizy.

Uwaga: Import i przypisanie alleli przy użyciu dostarczonych szablonów oceny można zagwarantować tylko dla GeneMapper™ ID/ID-X Software. W przypadku użycia GeneMapper™, mogą wystąpić problemy podczas importowania niektórych szablonów oceny.

Uwaga: Dostępne szablony dla pojemników i zestawów paneli definiują długość fragmentów poszczególnych fragmentów. Ze względu na niewielkie różnice w wydajności różnych urządzeń do elektroforezy kapilarnej w żelu, mogą występować niewielkie odchylenia między urządzeniami. Specyficzne dostosowanie pojemników i paneli przez H BIOTYPE GmbH jest możliwe, prosimy o kontakt poprzez support@biotype.de.

Tabela 11 Przegląd dostępnych szablonów do zaimportowania do GeneMapper™ ID/ID-X

Szablon	Nazwa	
Panels	AMLplex_Panels_v2/v2x	lub wyższa wersja
BinSets	AMLplex_Bins_v2/v2x	lub wyższa wersja
Size Standard	SST-BT0_60-550bp	
Analysis Method	AMLplex_HID_310_200RFU	Zalecane
	AMLplex_HID_3130_200RFU	Zalecane
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Setting	Table for 10 Alleles	
	Table for 22 Alleles	

Jeśli metoda analizy jest tworzona ręcznie, należy wybrać następujące parametry (Tabela 12).

Tabela 12 Parametry dla ręcznego tworzenia metody analizy w aplikacji GeneMapper™ ID/ID-X

Parametry	Ustawienie
Peak Detection Algorhythm	Advanced
Allele	No specific stutter ratio, set all to 0.0
	Amelogenin cut off: 0.0
Ranges	Analysis: Full Range
	Sizing: All Sizes
Smoothing and Baselineing	Smoothing: Light
	Baseline Window: 51 pts
Size Calling Method	Local Southern Method
Peak Detection	Peak Amplitude Thresholds
	B: 200; Y: 200; G: 200; R: 200; O: 50
	Min. Peak Half Width: 2 pts
	Polynomial Degree: 3
	Peak Window Size: 15 pts*
Peak Quality	Slope Thresholds: 0.0
	Heterozygote Balance: 0.0
	Max expected alleles: 22

* W razie potrzeby rozmiar okna pików można zmniejszyć do 11 pkt.

10.2 Procedura analizy danych

10.2.1 Ogólne minimalne wymagania dotyczące analizy danych

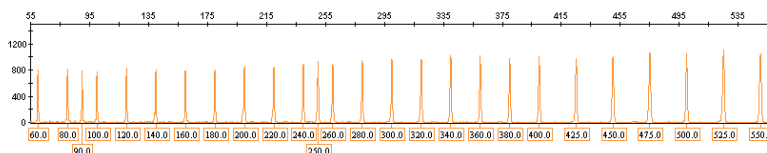
Pliki fsa z elektroforezy kapilarnej w żelu są analizowane jakościowo, tj. sprawdzane pod kątem obecności pików amplifikacji. Zasadą jest, że szczyt musi osiągać co najmniej 200 RFU wysokości i powinien być co najmniej 3 razy większy niż poziom szumu linii bazowej. Kryteria te mają zastosowanie do pików kontrolnych (kontrola QA i ABL), jak również do pików fuzji genów.

Jedynym wyjątkiem jest standard wielkości DNA Size Standard 550 (BTO), w którym minimalna wysokość pików musi wynosić 50 RFU.

10.2.2 Testowanie standardu długości DNA Size Standard 550 (BTO)

Określenie dokładnej długości fragmentów amplifikowanych produktów zależy od zastosowanego standardu długości DNA. Ze względu na złożoność niektórych loci, do określenia długości należy użyć jak największej liczby równomiernie rozłożonych punktów odniesienia. W tym celu należy użyć testu DNA Size Standard 550 (BTO) (Ilustracja 1) z fragmentami o długości 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 i 550bp.

Sprawdzić na elektroferogramie (kanał pomarańczowy) wszystkich próbek, czy wszystkie allele standardu wielkości są obecne, mają wystarczającą wysokość pików wynoszącą co najmniej 50 RFU i zostały prawidłowo przypisane (por. Ilustracja 1).



Ilustracja 1 Elektroferogram DNA Size Standard 550 (BTO), analizowany na ABI 3500, Software GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, oś y: 55-560 bp, oś x: 0-1 500 RFU

Uwaga: Jeśli nie wszystkie fragmenty standardu wielkości są analizowane w różnych próbkach, drabina alleliczna i próbki mogą nie zostać odpowiednio ocenione. W związku z tym zawsze należy sprawdzać standard wielkości w celu pomyślnej analizy.

10.2.3 Testowanie drabiny allelicznej/Allelic Ladder

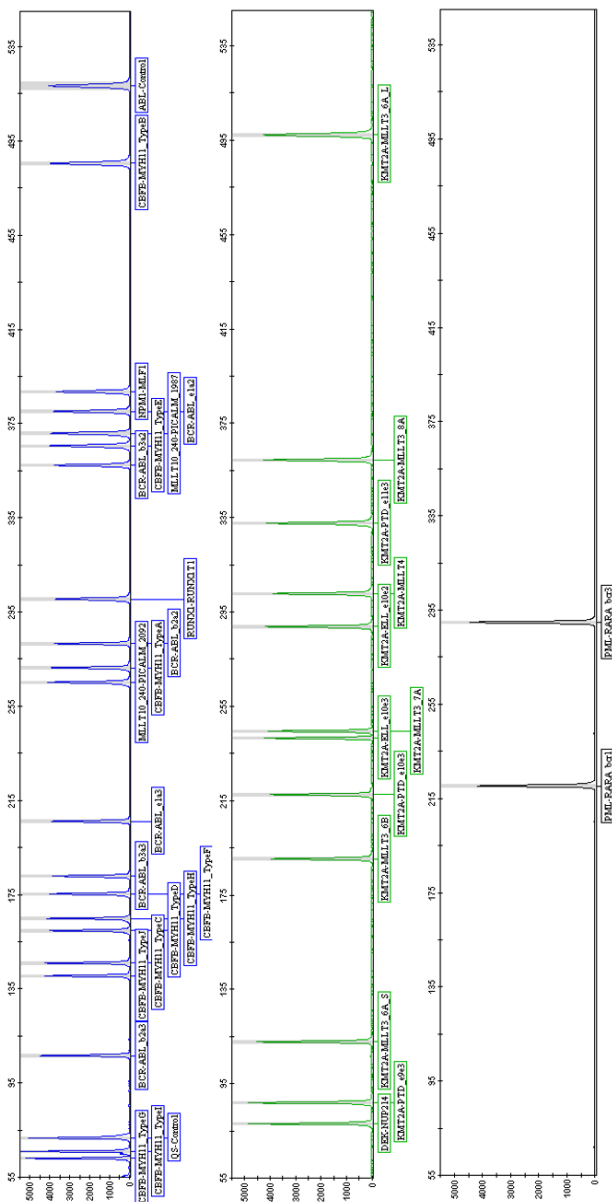
Drabina alleliczna zawiera wszystkie fragmenty wykrywalne za pomocą Mentype® AMLplex^{QS} (por. Tabela i Ilustracja 2). W związku z tym fragmenty te muszą być

obecne w drabinie allelicznej i być wykrywane na wysokości co najmniej 200RFU. Geny fuzyjne i odpowiadające im warianty transkryptu są zawsze zlokalizowane w jednym kanale koloru.

Tabela 13 Przegląd rozkładu fuzji genów w kanałach kolorów

Niebieski kanał kolorów	Zielony kanał kolorów	Żółty kanał kolorów
CBFB::MYH11	DEK::NUP214 (DEK-CAN)	PML::RARA
BCR::ABL	KMT2A::MLLT4 (MLL-AF6)	
PICALM::MLLT10 (CALM-AF10)	KMT2A::MLLT3 (MLL-AF9)	
RUNX1::RUNX1T1 (AML1-ETO)	KMT2A::ELL (MLL-ELL)	
NPM1::MLF1	KMT2A-PTD (MLL-PTD)	
Kontrola jakości i ABL		

Uwaga:Jeśli nie wszystkie fragmenty drabiny allelicznej są nazywane automatycznie podczas korzystania z szablonów oceny (szczególnie w przypadku zestawów pojemników i paneli), prosimy o kontakt z support@biotype.de, ponieważ może być konieczne dostosowanie szablonów do ustawień użytkownika. W takim przypadku możliwe jest, że piki w próbkach nie mogą być przypisane.



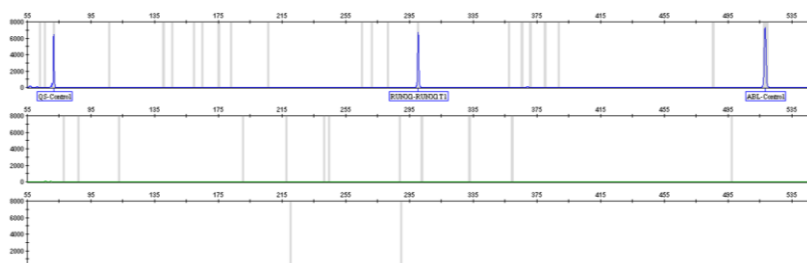
Ilustracja 2 Elektroferogram Mentepe® AMLplex^{OS} Allelic Ladder, analizowanej na ABI 3500, ocena GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, oś y: 55-550 bp, oś x: 0,5 500 RFU

10.2.4 Testowanie Mentype® AMLplex^{QS} Control cDNA Kasumi 1

Zestaw zawiera pozytywną kontrolę Mentype® AMLplex^{QS} Control cDNA Kasumi 1*, która jest pozytywna dla fuzji genów RUNX1::RUNX1T1 (AML1-ETO).

Sprawdź, czy szczyty kontrolne QS-Control i ABL-Controls są wyświetlane na wystarczającej wysokości. Sprawdź, czy pik dla translokacji RUNX1::RUNX1T1 pojawia się z wystarczającą wysokością na elektroferogramie (Ilustracja). Sprawdź, czy na elektroferogramie nie pojawiają się nieoczekiwane produkty uboczne.

*Hodowlę komórkową do przygotowania cDNA uzyskano z: DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Niemcy. Wykorzystanie tego cDNA jest przeznaczone wyłącznie dla Mentype® AMLplex^{QS}.

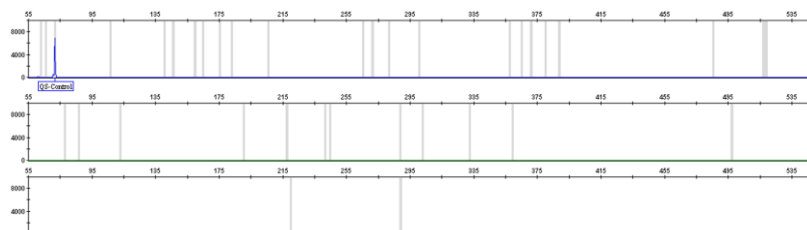


Ilustracja3 Elektroferogram Mentype® AMLplex^{QS} Control cDNA Kasumi 1 analizowany na ABI 3500, GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x oś y 55-550 bp, oś x 0-8 000 RFU

10.2.5 Sprawdzanie kontroli negatywnej

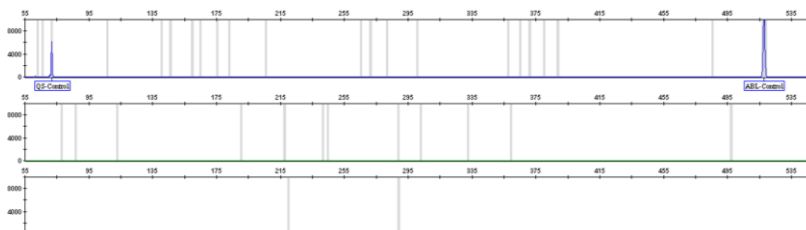
Sprawdź, czy na elektroferogramie (kanał niebieski, zielony, żółty) nie pojawiają się piki specyficzne dla translokacji większe niż 200RFU.

No-Template Control: Sprawdź, czy tylko pik kontrolny QS-Control pojawia się z wystarczającą wysokością, ale nie pik ABL-Control (Ilustracja).



Ilustracja4 Elektroferogram kontroli bez wzorca, analizowany pod kątem ABI 3500, GeneMapper ID-X 1.4, Template Files v3x oś y 0-10 000 RFU, oś x 55-550 bp

Ujemna próbka kontrolna (nie wchodzi w skład zestawu): Sprawdzić, czy dla znanego cDNA, które jest negatywne dla wykrywalnych fuzji genów i translokacji, piki kontrolne QS-Control i ABL-Control mają wystarczającą wysokość (Ilustracja).



Ilustracja 5 Elektrofereogram negatywnej próbki kontrolnej, analizowany pod kątem ABI 3500, GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x oś y 0-10 000 RFU, oś x 55-550 bp

10.2.6 Analiza przykładowych danych

Po przetestowaniu standardów wielkości, drabin allelicznych i próbek kontrolnych, dane próbki są analizowane.

Uwaga: Mentye® **AMLplex^{QS}** jest testem czysto jakościowym. Ocena ilościowa, np. w ramach określenia MRD Measurable residual disease - minimalna choroba resztkowa) jest wyraźnie niemożliwa.

Podczas korzystania z szablonów oceny BIOTYPE GmbH i pomyślnej oceny drabiny allelicznej przebiegu, wykryte fragmenty PCR są automatycznie nazywane. Przegląd długości fragmentów produktów PCR można znaleźć w tabeli 14.

Uwaga: Mentye® **AMLplex^{QS}** został zatwierdzony pod kątem POP-4™ i certyfikowany. Użycie innego polimeru (np. POP-7™ lub POP-6™) może zmienić zachowanie specyficznych produktów PCR. Konieczne może być dostosowanie BIOTYPE Templates (Panels i BinSet). Prosimy o kontakt z naszym wsparciem technicznym (support@biotype.de). Ponadto zaobserwowano zwiększony szum tła spowodowany zmianą zachowania wolnych pozostałości barwnika fluorescencyjnego.

Tabela 14 Przegląd długości fragmentów poszczególnych translokacji w drabinie allelicznej Mentype® **AMLplex**^{QS}, określone przy użyciu POP-4TM; † dla wariantu KMT2A::MLLT3_6A spodziewane są dwa amplikony; * Ze względu na zmienną długość amplikonu PML::RARA_bcr2 (ok. 173 bp), wariantu nie można przypisać automatycznie, ale można go wykryć za pomocą starterów Mentype® **AMLplex**^{QS}

Panel/Translokacja	Rozmiar [bp]	Panel/Translokacja	Rozmiar [bp]
Kanał niebieski		Kanał zielony	
CBFB::MYH11_TypeG	63	DEK::NUP214	78
CBFB::MYH11_TypeI	66	KMT2A-PTD_e9e3	87
QS-Control	72	KMT2A::MLLT3_6A_S [†]	113
BCR::ABL_b2a3	107	KMT2A::MLLT3_6B	191
CBFB::MYH11_TypeJ	141	KMT2A-PTD_e10e3	218
CBFB::MYH11_TypeC	146	KMT2A::ELL_e10e3	242
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	333
BCR::ABL_e1a3	206	KMT2A::MLLT3_8A	360
MLLT10_240::PICALM_2092	265	KMT2A::MLLT3_6A_L [†]	498
CBFB::MYH11_TypeA	271	Żółty kanał	
BCR::ABL_b2a2	282	PML::RARA_bcr1	220
RUNX1::RUNX1T1	301	PML::RARA_bcr3	288
BCR::ABL_b3a2	358	<i>PML::RARA_bcr2*</i>	
CBFB::MYH11_TypeE	365		
MLLT10_240::PICALM_1987	371		
BCR::ABL_e1a2	380		
NPM1::MLF1	389		
CBFB::MYH11_TypeB	486		
ABL-Control	518		

11. Troubleshooting

Opisana wcześniej analiza post-PCR z automatycznym przypisywaniem alleli zapewnia precyzyjne i niezawodne rozróżnienie transkryptów genów fuzyjnych i ich wariantów. Sprawdźcie prawidłowe przypisanie alleli w drabinie allelicznej w każdym przebiegu.

11.1 Limit detekcji

W eksperymentach z plazmidami, granica wykrywalności ≤ 1000 kopii została określona dla 32 z 34 wariantów transkryptu przy liczbie cykli 25. Warianty transkrypcyjne CBF6::MYH11_Type C i KMT2A::MLLT4 (MLL-AF6) odbiegają od tego. Przy liczbie cykli wynoszącej 28 można określić 1000 kopii CBF6::MYH11_Type C i 10 000 kopii KMT2A::MLLT4 (MLL-AF6). Jeśli dostępna jest określona liczba kopii, można osiągnąć szczytowe wysokości > 200 RFU .

Aplikacja ta jest narzędziem przesiewowym opartym na PCR, które zostało opracowane, zatwierdzone i certyfikowane do klasyfikacji podtypów AML. Ta aplikacja nie jest odpowiednia do kwantyfikacji lub monitorowania MRD- .

11.2 Prześwietlenie (Pull-up Peaks)

Mogą wystąpić zakłócenia między kolorowymi panelami, jeśli do analizy użyto nieodpowiedniej matrycy lub wysokości pików produktu PCR znajdujących się poza liniowym zakresem wykrywania urządzenia. Pojawiają się one w tej samej pozycji, co określone piki w innych kolorowych panelach (zwykle o niższej intensywności sygnału).

Uwaga: Jeśli to konieczne, rozcieńczyć produkty PCR przed elektroforezą kapilarną w żelu, aby uzyskać wyraźne wyniki analizy. Matrycę należy wymienić w przypadku prześwietlenia pomimo optymalnej wysokości fluorescencji.

11.3 Przyłączanie nukleotydów niezależne od szablonu

Ze względu na swoją aktywność terminalnej transferazy Multi Taq 2 DNA Polymerase preferuje przyłączanie adozyny do 3'-końca amplifikowanego fragmentu DNA. Jeśli system PCR nie ma wystarczająco dużo czasu na wydłużenie lub jeśli sekwencje starterów nie sprzyjają wydłużeniu, wyżarzanie nie ma miejsca. Artefakt ten można rozpoznać po występowaniu fragmentu skróconego o jedną zasadę (pik -1 bp). Wszystkie BIOTYPE Primer są zaprojektowane w taki sposób, aby zminimalizować powstawanie artefaktów. Ponadto, powstawanie artefaktów jest ograniczone przez końcowy etap przedłużania w protokole PCR (68 °C przez 10 min). Wysokość pików artefaktu wzrasta przy dużych ilościach cDNA. Aby ocenić wartości szczytowe, każde laboratorium analityczne powinno zdefiniować własne wartości graniczne.

11.4 Artefakty

Temperatura pokojowa może silnie wpływać na zachowanie produktów PCR na urządzeniach kapilarnych i może prowadzić do występowania ramion lub podwójnych pików (Split Peaks, jeśli temperatura jest zbyt niska. Ponadto automatyczne przypisywanie alleli może być

zakłócone. Jeśli efekty te zostaną zaobserwowane, zalecamy ponowne wstrzyknięcie próbek, w miarę możliwości z kilkoma drabinami allelicznymi na przebieg. Należy upewnić się, że przestrzegana jest temperatura robocza zalecana przez producenta urządzenia. Idealna jest stabilna temperatura pokojowa > 22 °C.

11.5 Wpływ rodzaju polimeru

Mentype® **AMLplex**^{QS} został zatwierdzony i certyfikowany w POP-4TM. Użycie innego polimeru (np. POP-7TM lub POP-6TM) może zmienić zachowanie się określonych produktów PCR. Konieczne może być dostosowanie BIOTYPE Templates (Panels i BinSet). Prosimy o kontakt z naszym wsparciem technicznym (support@biotype.de). Ponadto zaobserwowano zwiększony szum tła spowodowany zmianą zachowania wolnych pozostałości barwnika fluorescencyjnego.

11.6 Niespecyficzne amplikony

Próbki, które są pozytywne dla określonej fuzji genów, mogą wykazywać dodatkowe niespecyficzne sygnały tła, widoczne jako amplikony o różnej długości na elektroferogramie. W próbkach pozytywnych o wysokiej intensywności sygnału, tło to może stać się bardziej wyraźne i może nawet skutkować wywołaniem niespecyficznych alleli, które przekraczają próg testu, jak opisano w rozdziale 10.2.1. Warto zauważyć, że niespecyficzne amplikony działające w wyznaczonych zakresach przedziałów testu są częściej obserwowane przy użyciu alternatywnych ustawień instrumentalnych, takich jak polimery POP-7TM i POP-1TM. W takich przypadkach kluczowe jest skupienie się tylko na sygnale fuzji genów o najwyższej intensywności i, jeśli to konieczne, potwierdzenie wyników za pomocą niezależnych metod, takich jak sekwencjonowanie. Z klinicznego punktu widzenia wykrycie więcej niż jednej fuzji genów w pojedynczej próbce pacjenta jest bardzo mało prawdopodobne[1]. Podkreśla to znaczenie krytycznej oceny wszystkich wykrytych sygnałów w celu zapewnienia dokładnej interpretacji wyników, szczególnie w porównaniu z innymi cechami sygnału, takimi jak wewnętrzna kontrola ABL lub najbardziej wyraźna amplifikacja.

Na przykład w próbkach CFBF::MYH11_Type A pozytywnych może się zdarzyć, że dodatkowe niespecyficzne sygnały amplikonu o niskiej intensywności są amplifikowane w zakresie fuzji genów RUNX1::RUNX1T1 lub CFBF::MYH11_Type F. W próbkach typu dzikiego niespecyficzne amplikony powyżej punktu granicznego testu nie są wykrywalne.

W przypadku jakichkolwiek niejasności, prosimy o kontakt z działem obsługi klienta BIOTYPE pod adresem support@biotype.de

[1] Chen, X., Wang, F., Wang, T., Zhang, Y., Ma, X., Yuan, L., Teng, W., Guo, L., Liu, M., Liu, M., Chen, J., Nie, D., Zhang, Y., Zhou, X., Wang, M., Chen, K., Zhu, P. & Liu, H. (2020). The incidence, genetic characteristics, and prognosis of leukemia with concurrent pathogenic fusion genes: a series of 25 cases from a large cohort of leukemia patients. *Cancer gene therapy*, 27 (1), 89-97

12. Informacje o zamówieniu

Tabela 15 Szczegółowe informacje dotyczące zamawiania zestawów Mentype® **AMLplex^{QS}**

Zestaw	Wielkość opakowania	Numer zamówienia
Mentype® AMLplex^{QS}	25 reakcji	45-31220-0025
Mentype® AMLplex^{QS}	100 reakcji	45-31220-0100
Mentype® AMLplex^{QS}	400 reakcji	45-31220-0400

13. Referencje

Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K, Kamada N (1991)

Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. *Blood* 77(9): 2031-2036.

Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJM, Hokland P, Gabert J (2003)

Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* 17:2474-2486.

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.

Chen, X., Wang, F., Wang, T., Zhang, Y., Ma, X., Yuan, L., Teng, W, Guo, L., Liu, M., Liu, M., Chen, J., Nie, D., Zhang, Y., Zhou, X., Wang, M., Chen, K., Zhu, P. & Liu, H. (2020).

The incidence, genetic characteristics, and prognosis of leukemia with concurrent pathogenic fusion genes: a series of 25 cases from a large cohort of leukemia patients. *Cancer gene therapy*, 27 (1), 89-97

14. Znaki towarowe i wyłączenie odpowiedzialności

Zarejestrowane nazwy, znaki towarowe itp. użyte w niniejszym dokumencie nie mogą być traktowane jako niechronione, nawet jeśli nie są wyraźnie oznaczone jako takie: BIOTYPE, Mentype® (BIOTYPE GmbH); ABI PRISM®, GeneMapper™, Hi-Di™ Formamide, POP-4™, POP-6™, POP-1™, POP-7™, Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); FAM™ (Life Technologies Ltd.).

Zestawy Mentype® **AMLplex^{QS}** są oznaczone znakiem CE zgodnie z europejską dyrektywą 98/79/WE dotyczącą wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro. Zestawy nie są dostępne jako diagnostyka in vitro poza tym obszarem regulacyjnym.

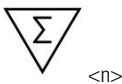
15. Symbole



Producent



Oznaczenie partii



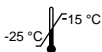
Wystarczające dla <n> testów



Odniesienie do eIFU



Może być używany do



Ograniczenie temperatury



Numer pozycji



Diagnostyka in vitro



Ochrona przed światłem słonecznym



Przechowywać w suchym miejscu

Weryfikacja i walidacja Mentype® AMLplex^{QS} Zestawy do amplifikacji PCR

A Walidacja analityczna

A a) Definicja standardowej reakcji i tolerancji specyficznych dla partii

Cel: Definicja standardowej reakcji i tolerancji specyficznych dla partii w odniesieniu do bezwzględnych poziomów sygnału (RFU), równowagi poziomów sygnału multipleksowej reakcji PCR i linii bazowej. Ponadto specyficzne dla testu ustawienia urządzenia do genotypowania przy użyciu elektroforezy kapilarnej w żelu (Bins i Panels) są określane na podstawie wyników przy użyciu szablonów oceny maszyn do sekwencjonowania DNA.

Metodologia: Do zestawu testowego dołączony jest kontrolny cDNA linii komórkowej KASUMI-1 (ACC220, Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig), która zawiera fużę genów RUNX1::RUNX1T1 (AML1-ETO) z aberracją chromosomalną t(8; 21) (q22; q22) [7]. Dodatkowo, zastosowano sztuczną mieszaninę plazmidów zawierającą 33 z 34 wykrywalnych wariantów. Standardową reakcję przeprowadzono z kontrolnym cDNA w nominalnym stężeniu 250 ng na preparat PCR i 25 cyklach PCR. Mieszaninę matryc dostosowano tak, aby wysokość sygnału w liniowym zakresie pomiarowym zastosowanych analizatorów została osiągnięta po 25 cyklach PCR (maks. 5000 RFU). Przeprowadzono początkowe oznaczenie z czterema wartościami ślepych (kontrola bez wzorca, NTC) bez DNA.

Wyniki: Zdefiniowano następujące specyfikacje dla mieszania starterów PCR specyficznych dla partii: Używając mieszaniny szablonów ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer uzyskano wysokość sygnału 1000-4000 RFU, a przy użyciu mieszaniny szablonów ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer uzyskano wysokość sygnału 1000-5000 RFU. Określone sygnały są wykrywane od wysokości sygnału 200 RFU. Nie wykryto żadnych niespecyficznych sygnałów (wolne barwniki, artefakty) w wartościach ślepych w zakresie skalowania > 200 RFU (linia bazowa).

A b) Testowanie dokładności pomiaru

Cel: Informacje na temat dokładności metody pomiaru i wystarczająco szczegółowe podsumowanie danych, aby umożliwić ocenę, czy środki ustalania dokładności są odpowiednie. Pomiaru dokładności mogą być stosowane zarówno w testach ilościowych, jak i jakościowych tylko wtedy, gdy dostępny jest wzorzec lub metoda referencyjna.

Metodologia: Zestaw jest walidowany poprzez regularne uczestnictwo w testach typu round robin i sprawdzany pod kątem prawidłowych wyników jakościowych (diagnostyka). BIOTYPE bierze od 3 czerwca 2013 r. regularnie udział w testach typu round robin United Kingdom National Quality Assessment Schemes (UKNEQAS www.ukneqas.org.uk) w celu wykrywania translokacji BCR-ABL i AML. Odbývają się one regularnie (2 razy) w roku i są analizowane przez władze.

Wyniki (Performance Status), również w porównaniu z innymi uczestnikami, zostaną przesłane po zakończeniu udziału.

Wyniki: Bieżący status wydajności to „Zielony”. Udowodniono, że produkt jest odpowiedni do wykrywania wariantów BCR-ABL i translokacji AML i osiąga prawidłowe wyniki (jakościowe) w porównaniu z innymi molekularnymi metodami genetycznymi.

A c) Testowanie specyficzności analitycznej

A c) a) Testowanie specyficzności analitycznej przy użyciu negatywnych wstępnie typowanych cDNA

Cel: Testy służyły do wykluczenia wyników fałszywie dodatnich z powodu interferencji i reaktywności krzyżowej z wybranymi cDNA z negatywnych próbek wstępnych (pacjentów i zdrowych dawców).

Metodologia: Przetestowano 22 cDNA, które były wstępnie negatywne dla wariantów translokacji wykrywanych w zestawie testowym. Zastosowane ilości miały na celu pokrycie zakresu stężeń oczekiwanych w praktyce klinicznej i wahały się od 145 ng do maksymalnie 934 ng cDNA na test PCR z 25 cyklami.

Wyniki: W zakresie alleli określonym przez Bins i Panels (Templates) nie wykryto reaktywności krzyżowej (> 200 RFU). Sygnał pomiarowy dla wewnętrznej kontroli cDNA (gen ABL) dla 21 cDNA wynosił >cDNAs > 200 RFU, w jednym przypadku ok. 50 RFU. Wartość graniczna dla automatycznego przypisywania alleli została ustawiona na 200 RFU.

A c) b) Testowanie specyficzności analitycznej przy użyciu pozytywnego wstępnie typowanego cDNA

Cel: Testy służyły do wykluczenia wyników fałszywie dodatnich z powodu interferencji i reaktywności krzyżowej starterów z wybranymi cDNA od pozytywnie wstępnie typowanych pacjentów.

Metodologia: Przetestowano 20 cDNA, które zostały pozytywnie wstępnie typowane dla wariantów translokacji, które mają być wykrywane w zestawie testowym. Użyta ilość została ustawiona na 250 ng cDNA na test PCR. Program PCR został przeprowadzony z 25 cyklami.

Wyniki: Wszystkie wcześniej określone mutacje somatyczne zostały wyraźnie wykryte. Nie wykryto reaktywności krzyżowej w zakresie alleli (> 50 RFU). Sygnały pomiarowe dla mutacji somatycznych i wewnętrznej kontroli cDNA (gen ABL) w 16/20 próbkach > 200 RFU i > 50 RFU w 3/20 próbkach. Jedna próbka osiągnęła wartości poniżej 50 RFU, ale wariant genu fuzyjnego był nadal wykrywalny. Wartość graniczna dla automatycznego przypisywania alleli została ustawiona na 200 RFU.

A d) Testowanie czułości analitycznej

Cel: Testy zostały wykorzystane do określenia analitycznej granicy wykrywalności testu (czułości).

Metodologia: Seria rozcieńczeń od 1 µg do 31,25 ng referencyjnego cDNA (Kasumi-1) została przetestowana w czterech powtórzeniach. Program PCR został przeprowadzony z 25 cyklami. Ponadto, serie rozcieńczeń sztucznie wytworzonego wzorca referencyjnego (plazmidy, GeneArt, Life Technologies) o określonej liczbie kopii były testowane w duplikatach dla każdego wykrywanego wariantu transkrypcji.

Wyniki: Do stężenia cDNA 62,5 ng, intensywność sygnału można wykryć zarówno dla specyficznej translokacji, jak i kontroli ABL > 200 RFU. Przy 31,25 ng intensywność sygnału specyficznego wariantu wynosiła > 200 RFU, a intensywność sygnału kontroli ABL wynosiła > 50 RFU. Optymalne wartości w odniesieniu do zakresu pomiarowego sekwenatora kapilarnego zostały osiągnięte w zakresie 150 ng – 250 ng. Pomiar rozcieńczeń plazmidu wykazały, że limit detekcji > 200 RFU z 100-1 000 kopii można osiągnąć dla wszystkich wariantów translokacji.

A e) Testowanie różnych termocyklorów PCR

Cel: Termocyklery PCR różnych producentów różnią się specyfikacjami. W szczególności mogą występować różne szybkości ogrzewania i chłodzenia oraz różne techniki kontroli temperatury.

Metodologia: Testowanie standardowych reakcji z kontrolnym DNA w nominalnym stężeniu 250 ng przeprowadzono za pomocą następujących termocyklorów w 4-krotnym oznaczeniu z tą samą mieszaniną wzorcową i 2 ślepyimi próbkami bez DNA: Thermocycler Eppendorf Mastercycler ep-S (Eppendorf AG, Hamburg), Applied Biosystems® GeneAmp 9700 z blokiem srebrnym (Life Technology GmbH, Darmstadt), Applied Biosystems® GeneAmp 9700 z blokiem aluminiowym (Life Technology GmbH, Darmstadt).

Wyniki: Prawidłowe przypisanie wszystkich amplikonów było możliwe na wszystkich typach termocyklorów. Wszystkie fragmenty mieszaniny szablonów zostały pomyślnie amplifikowane.

A f) Testowanie wpływu różnych temperatur wyżarzania w PCR

Cel: Aby określić odporność reakcji PCR, symulowane są wahania temperatury dla etapu wyżarzania starterów (Annealing) multipleksowej reakcji PCR). Ten etap temperaturowy ma kluczowe znaczenie dla czułości i specyficzności reakcji PCR.

Metodologia: Specyficzna dla zestawu Annealingtemperatura 60 °C standardowej reakcji z kontrolnym DNA w nominalnym stężeniu 250 ng była zmieniana o ± 1 °C i ± 2 °C. Przeprowadzono 3-krotne oznaczenie przy użyciu tej samej mieszaniny wzorcowej.

Wyniki: Zestaw w przypadku wahań urządzenia technicznego ± 1 °C jest stabilny w określonej temperaturze Annealing. Optymalna wysokość sygnału we wszystkich systemach Annealing została osiągnięta przy temperaturze 61 °C.

A g) Testowanie różnych partii buforów PCR

Cel: Stosunki stężeń składników mieszaniny reakcyjnej A buforu PCR (dNTP, stężenia jonów, zwłaszcza Mg^{2+}) są decydujące dla czułości, specyficzności i równowagi sygnałów w multipleksowym PCR. W związku z tym testowana jest odporność testu na wahania partii dostarczonego buforu PCR.

Metodologia: Testowanie 3 niezależnych partii REM-A przeprowadzono w standardowej reakcji z kontrolnym DNA o nominalnym stężeniu 250 ng, a także drabiną alleliczną i linią cDNA o słabej ekspresji (KMT2A::MLLT4 (MLL-AF6)).

Wyniki: Każda nowo wyprodukowana partia REM A jest testowana przy użyciu Mentype® **AMLplex^{QS}** PCR Amplification Kit. Partia REM A jest zwolniona tylko wtedy, gdy wyniki osiągnięte przy jej użyciu Mentype® **AMLplex^{QS}** są zgodne ze specyfikacją.

A h) Okres trwałości po otwarciu

Cel: Stabilność odczynników w zestawie PCR była testowana po wielokrotnym zamrażaniu i rozmrażaniu.

Metodologia: Odczynniki zestawu zostały poddane 20-krotnemu cyklowi zamrażania i rozmrażania. Zamrażanie przeprowadzono przez co najmniej 1 godzinę w temperaturze -20 °C. Rozmrażanie odbywało się w temperaturze pokojowej, a przed użyciem odczynniki homogenizowano przez wytrząsanie. Następnie przeprowadzono standardową reakcję z kontrolnym DNA w nominalnym stężeniu 250 ng i dodatkowymi ślepyimi wartościami bez DNA w trzech powtórzeniach. Ocenę przeprowadzono w porównaniu do standardowej reakcji bez cyklu zamrażania i rozmrażania.

Wyniki: Odchylenie uśrednionych wysokości pików w porównaniu do standardowej odpowiedzi wynosiło maksymalnie 20 % (w szczególności utrata sygnału). Nie wykryto żadnych dodatkowych pików > 50 RFU w wartościach ślepych w zakresie skalowania.

B Dane dotyczące wydajności klinicznej

B a) Pobieranie próbek, aspekty etyczne i regulacyjne

Test oceny działania został przeprowadzony zgodnie z sekcjami 20-24 niemieckiej ustawy o wyrobach medycznych (DE). Federalny Instytut ds. Leków i Wyrobów Medycznych przyznał zwolnienie z wymogu uzyskania zezwolenia dla wyrobów medycznych o niskim ryzyku bezpieczeństwa zgodnie z § 7 rozporządzenia w sprawie badań klinicznych wyrobów medycznych. Dostępna była pozytywna opinia właściwej komisji etycznej oraz formularze zgody pacjentów.

Wykorzystano pełną krew żylną od 297 pacjentów i 10 zdrowych ochotników.

B b) Testy porównawcze

Głównym celem jest określenie czułości i swoistości diagnostycznej w porównaniu z metodami referencyjnymi. Do selekcji translokacji dostępne były standaryzowane metody cytogenetyczne (kariotypowanie, analizy FISH) [8]. W przypadku translokacji, których nie można było uwidocznić cytogenetycznie, zastosowano zwalidowane i uznane testy PCR typu monoplex nested [9, 10].

B c) Ekstrakcja i oczyszczanie DNA

Komórki jednojądrzaste (MNC) uzyskano z heparynizowanej krwi pełnej metodą wirowania w gradnicie gęstości. Całkowity mRNA został następnie wyekstrahowany przy użyciu dostępnych w handlu zestawów do ekstrakcji mRNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, DE). Został on przepisany na cDNA przy użyciu dostępnych w handlu zestawów (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen GmbH, Hilden, DE). Jakość cDNA została przetestowana przy użyciu Realtime-PCR (zwalidowanego testu wewnętrznego). Poszczególne geny fuzyjne lub mutacje zostały przetestowane przy użyciu zatwierdzonych indywidualnych reakcji PCR.

B d) Wyniki

Mentype® **AMLplex^{QS}** PCR Amplification Kit nie wykazały one mutacji z cDNA od 10 zdrowych ochotników. Wyniki te nie zostały uwzględnione w dalszych obliczeniach wyników. Następnie przeanalizowano 297 próbek pobranych od pacjentów. Spośród nich 5 próbek nie mogło zostać przeanalizowanych (sygnał kontrolny dla ABL poniżej zalecanej wartości progowej). Z pozostałych 292 próbek, 199 uznano za prawidłowo ujemne w porównaniu z kariotypowaniem, FISH i/lub kontrolnym PCR. Spośród prawidłowo negatywnych próbek, 56 wykazało zmiany genetyczne (nieprawidłowości chromosomalne) w kariogramie, które nie mogą być rozpoznane przez zestaw testowy. Można to wytłumaczyć faktem, że chociaż Mentype® **AMLplex^{QS}** PCR Amplification Kit zawiera najczęstsze translokacje, obejmuje tylko około 37 % nieprawidłowości genetycznych często obserwowanych w AML [8]. Poszczególne wyniki testów porównawczych podsumowano w tabeli 17.

Ogólnie uzyskano czułość diagnostyczną na poziomie 94 % i swoistość diagnostyczną na poziomie 99,5 %. Wszystkie wyniki cytogenetyczne zweryfikowane za pomocą kontrolnego PCR [9, 10] zostały jednoznacznie potwierdzone.

Tabela 16 Podsumowanie wyników testu oceny wydajności, * [8]

Gen fuzja	Biomarkery		Ocena testu wydajności klinicznej (n=292)						
	Aberracja chromosomalna	Wariant	Częstość występowania [%] *	Prawidłowy Pozytywny	Prawidłowy Negatywny	Błąd Pozytywny	Błąd Negatywny	Czułość diagnostyczna [%]	Specyficzność diagnostyczna [%]
RUNX1:: RUNX1T1	t(8;21) (q22;q22)	NA	7	14	277	0	1	93.3	100.0
BCR:: ABL	t(9;22) (q34;q11)	e1a3 e1a2 b3a2 b3a3 b2a2 b2a3	1	1	291	0	0	100.0	100.0
PICALM:: MLLT10	t(10;11) (p13;q14)	MLLT10_240- PICALM_1987 MLLT10_240- PICALM_2092	1	0	262	0	0	NA	100.0
CBFB:: MYH11	inv(16) (p13;q22)	Type A Type B Type C Type D Type E Type F Type G Type H Type I Type J	5	25	264	1	2	92.6	99.6
DEK:: NUP214	t(6;9) (p23;q34)	NA	1	3	289	0	0	100.0	100.0
KMT2A:: MLLT4	t(6;11) (q27;q23)	NA	< 0.5	0	292	0	0	NA	100.0
KMT2A:: MLLT3	t(9;11) (p22;q23)	6A_(THP-1) 7A_(10A) 8A_(MM6) 6B_(9B)	1	4	287	0	1	80.0	100.0
KMT2A:: ELL	t(11;19) (q23;p13.1)	e10e2 e10e3	1	0	291	0	1	0	100.0
KMT2A- PTD	Częściowy Duplikacja tandemowa	e9e3 e10e3 e11e3	5-7	23	269	0	0	100.0	100.0
NPM1:: MLF1	t(3;5) (q25.1;q34)	NA	< 0.5	1	291	0	0	100.0	100.0
PML:: RARA	t(15;17) (q22;q21)	bcr1 (PR-L) bcr2 (PR-V) bcr3 (PR-S)	13	8	284	0	0	100.0	100.0
Łącznie			37	79	207	1	5	94.0	99.5

B e) Literatura na temat biomarkerów i ich sekwencji DNA

Dokumenty przeglądowe i cytowania baz danych DNA:

Thiede C. Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. *Am J Pharmacogenomics* 2004; 4: 177-87.

Mohr B, Koch R, Thiede C, Kroschinsky F, Ehninger G, Bornhäuser M. CD34+ cell dose, conditioning regimen and prior chemotherapy: factors with significant impact on the early kinetics of donor chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 949-54.

Bacher U, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2007 Jun;92(6):744-52. *PubMed PMID: 17550846.*

Huret JL, Dessen P, Bernheim A. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, year 2003. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jan 1;31(1):272-4. *PubMed PMID: 12520000; PubMed Central PMCID: PMC165573.*

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937-51. *Epub 2009 Apr 8. Review. PubMed PMID: 19357394.*

Wybrana literatura na temat AML1-ETO, t(8;21)(q22;q22):

Licht JD. AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene*. 2001 Sep 10;20(40):5660-79. *Review. PubMed PMID: 11607817.*

Lo Coco F, Piseigna S, Diverio D. The AML1 gene: a transcription factor involved in the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemias. *Haematologica*. 1997 May-Jun;82(3):364-70. *Review. PubMed PMID: 9234595.*

Nucifora G, Rowley JD. AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1995 Jul 1;86(1):1-14. *Review. PubMed PMID: 7795214.*

Richkind K, Hromas R, Lytle C, Crenshaw D, Velasco J, Roherty S, Srinivasiah J, Varella-Garcia M. Identification of two new translocations that disrupt the AML1 gene. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000 Oct 15;122(2):141-3. *Review. PubMed PMID: 11106827.*

Roumier C, Fenaux P, Lafage M, Imbert M, Eclache V, Preudhomme C. New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies. *Leukemia*. 2003 Jan;17(1):9-16. Review. PubMed PMID: 12529654.

Wybrana literatura na temat BCR-ABL, t(9;22)(q34;q11):

Burmeister T, Reinhardt R. A multiplex PCR for improved detection of typical and atypical BCR-ABL fusion transcripts. *Leuk Res*. 2008 Apr;32(4):579-85. Epub 2007 Oct 24. PubMed PMID: 17928051.

Emilia G, Luppi M, Ferrari MG, Temperani P, Marasca R, Giacobbi F, Vaccari P, Bandieri E, Di Donato C, Carapezzi C, Torelli G. Chronic myeloid leukemia with thrombocytopenic onset may be associated with different BCR/ABL variant transcripts. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998 Feb;101(1):75-7. PubMed PMID: 9460506.

Jones D, Luthra R, Cortes J, Thomas D, O'Brien S, Bueso-Ramos C, Hai S, Ravandi F, de Lima M, Kantarjian H, Jorgensen JL. BCR-ABL fusion transcript types and levels and their interaction with secondary genetic changes in determining the phenotype of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Blood*. 2008 Dec 15;112(13):5190-2. Epub 2008 Sep 22. PubMed PMID: 18809762; PubMed Central PMCID: PMC2597614.

Kim TD, Türkmen S, Schwarz M, Koca G, Nogai H, Bommer C, Dörken B, Daniel P, le Coutre P. Impact of additional chromosomal aberrations and BCR-ABL kinase domain mutations on the response to nilotinib in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2010 Apr;95(4):582-8. Epub 2009 Dec 16. PubMed PMID: 20015884; PubMed Central PMCID: PMC2857187.

Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1619-30. Epub 2008 Sep 30. Review. PubMed PMID: 18827185.

Wybrana literatura na temat DEK-CAN, t(6;9)(p23;q34):

Soekarman D, von Lindern M, Daenen S, de Jong B, Fonatsch C, Heinze B, Bartram C, Hagemeijer A, Grosveld G. The translocation (6;9) (p23;q34) shows consistent rearrangement of two genes and defines a myeloproliferative disorder with specific clinical features. *Blood*. 1992 Jun 1;79(11):2990-7. PubMed PMID: 1586743.

Soekarman D, von Lindern M, van der Plas DC, Selli L, Bartram CR, Martiat P, Culligan D, Padua RA, Hasper-Voogt KP, Hagemeijer A, et al. Dek-can rearrangement in translocation (6;9)(p23;q34). *Leukemia*. 1992 Jun;6(6):489-94. PubMed PMID: 1602786.

Wybrana literatura na temat CALM-AF10, t(10;11)(p13;q22):

Jones LK, Chaplin T, Shankar A, Neat M, Patel N, Samuel DP, Hill AS, Debernardi S, Bassini A, Young BD, Saha V. Identification and molecular characterisation of a CALM-AF10 fusion in acute megakaryoblastic leukaemia. *Leukemia*. 2001 Jun;15(6):910-4. PubMed PMID: 11417476

Wybrana literatura na temat CBFB-MYH11, inv(16) (p13;q22):

Corbacioglu A, Scholl C, Schlenk RF, Eiwen K, Du J, Bullinger L, Fröhling S, Reimer P, Rummel M, Derigs HG, Nachbaur D, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Döhner K. Prognostic impact of minimal residual disease in CBFB-MYH11-positive acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Aug 10;28(23):3724-9. Epub 2010 Jul 12. PubMed PMID: 20625124.

Mühlematter D, Lafage-Pochitaloff M, Gabert J, Reiffers J, Bilhou-Nabera C, van Ommen GJ, Hagemeijer A, Breuning MH. Genomic acute myeloid leukemia-associated inv(16)(p13q22) breakpoints are tightly clustered. *Oncogene*. 1999 Jan 14;18(2):543-50. PubMed PMID: 9927211.

Roth CG, Contis L, Gupta S, Agha M, Safyan E. De novo acute myeloid leukemia with Philadelphia chromosome (BCR-ABL) and inversion 16 (CBFB-MYH11): report of two cases and review of the literature. *Leuk Lymphoma*. 2011 Mar;52(3):531-5. Epub 2011 Feb 1. Review. PubMed PMID: 21281226

Wybrana literatura na temat MLL-AF6, t(6;11)(q27;q23):

Prasad R, Gu Y, Alder H, Nakamura T, Canaani O, Saito H, Huebner K, Gale RP, Nowell PC, Kuriyama K, et al. Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with the t(6;11) chromosome translocation. *Cancer Res*. 1993 Dec 1;53(23):5624-8. PubMed PMID: 8242616.

Welborn JL, Jenks HM, Hagemeijer A. Unique clinical features and prognostic significance of the translocation (6;11) in acute leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993 Feb;65(2):125-9. Review. PubMed PMID: 8453597.

Wybrana literatura na temat MLL-AF9, t(9;11)(q22;q23):

Giugliano E, Rege-Cambrin G, Scaravaglio P, Serra A, Włodarska I, Emanuel B, Saglio G, Hagemeijer A. MLL-AF6 fusion resulting from a new three-way translocation t(6;11;7) in a patient with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2001 Oct;15(10):1674-6. PubMed PMID: 11587234.

Mitterbauer G, Zimmer C, Pirc-Danoewinata H, Haas OA, Hojas S, Schwarzhinger I, Greinix H, Jäger U, Lechner K, Mannhalter C. Monitoring

of minimal residual disease in patients with MLL-AF6-positive acute myeloid leukaemia by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Br J Haematol.* 2000 Jun;109(3):622-8. PubMed PMID: 10886213.

Strehl S, König M, Mann G, Haas OA. Multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction screening in childhood acute myeloblastic leukemia. *Blood.* 2001 Feb 1;97(3):805-8. PubMed PMID: 11157501.

Tanabe S, Zeleznik-Le NJ, Kobayashi H, Vignon C, Espinosa R 3rd, LeBeau MM, Thirman MJ, Rowley JD. Analysis of the t(6;11)(q27;q23) in leukemia shows a consistent breakpoint in AF6 in three patients and in the ML-2 cell line. *Genes Chromosomes Cancer.* 1996 Apr;15(4):206-16. PubMed PMID: 8703846.

Wybrana literatura na temat MLL-ELL, t(11;19)(q23;p13.1):

Huret JL, Brizard A, Slater R, Charrin C, Bertheas MF, Guilhot F, Hählen K, Kroes W, van Leeuwen E, Schoot EV, et al. Cytogenetic heterogeneity in t(11;19) acute leukemia: clinical, hematological and cytogenetic analyses of 48 patients--updated published cases and 16 new observations. *Leukemia.* 1993 Feb;7(2):152-60. Review. PubMed PMID: 8426468.

Mitani K, Kanda Y, Ogawa S, Tanaka T, Inazawa J, Yazaki Y, Hirai H. Cloning of several species of MLL/MEN chimeric cDNAs in myeloid leukemia with t(11;19)(q23;p13.1) translocation. *Blood.* 1995 Apr 15;85(8):2017-24. PubMed PMID: 7718874.

Wybrana literatura na temat MLL-PTD, częściowej tandemowej duplikacji:

Basecke J, Whelan JT, Griesinger F, Bertrand FE. The MLL partial tandem duplication in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2006 Nov;135(4):438-49. Epub 2006 Sep 11. Review. PubMed PMID: 16965385.

Pajuelo-Gámez JC, Cervera J, García-Casado Z, Mena-Durán AV, Valencia A, Barragán E, Such E, Bolufer P, Sanz MA. MLL amplification in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007 Apr 15;174(2):127-31. PubMed PMID: 17452254.

Shih LY, Liang DC, Fu JF, Wu JH, Wang PN, Lin TL, Dunn P, Kuo MC, Tang TC, Lin TH, Lai CL. Characterization of fusion partner genes in 114 patients with de novo acute myeloid leukemia and MLL rearrangement. *Leukemia.* 2006 Feb;20(2):218-23. PubMed PMID: 16341046.

Whitman SP, Ruppert AS, Marcucci G, Mrózek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Vukosavljevic T, Powell BL, Carroll AJ, Koltitz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Bloomfield CD. Long-term disease-free survivors

with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and MLL partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12):5164-7. Epub 2007 Mar 6. PubMed PMID: 17341662; PubMed Central PMCID: PMC1890839.

Wybrana literatura na temat NPM1-MLF1, t(3;5)(q25.1;q34):

Arber DA, Chang KL, Lyda MH, Bedell V, Spielberger R, Slovak ML. Detection of NPM/MLF1 fusion in t(3;5)-positive acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Hum Pathol*. 2003 Aug;34(8):809-13. PubMed PMID: 14506644.

Yoneda-Kato N, Look AT, Kirstein MN, Valentine MB, Raimondi SC, Cohen KJ, Carroll AJ, Morris SW. The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene*. 1996 Jan 18;12(2):265-75. PubMed PMID: 8570204.

Wybrana literatura na temat PML-RARA, t(15;17)(q22;q21):

Alcalay M, Zangrilli D, Pandolfi PP, Longo L, Mencarelli A, Giacomucci A, Rocchi M, Biondi A, Rambaldi A, Lo Coco F, et al. Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukemia lies within the retinoic acid receptor alpha locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Mar 1;88(5):1977-81. PubMed PMID: 1848017; PubMed Central PMCID: PMC51149.

Pandolfi PP, Alcalay M, Fagioli M, Zangrilli D, Mencarelli A, Diverio D, Biondi A, Lo Coco F, Rambaldi A, Grignani F, et al. Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J*. 1992 Apr;11(4):1397-407. PubMed PMID: 1314166; PubMed Central PMCID: PMC556589.

Dalsze odniesienia

Wenz H, Robertson JM, Menchen S, Oaks F, Demorest DM, Scheibler D, Rosenblum BB, Wike C, Gilbert DA, Efcavitch JW. High-precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis. *Genome Res* 1998; 8: 69-80.

Sguelgia JB, Geiger S, Davis J. Precision studies using the ABI prism 3100 genetic analyzer for forensic DNA analysis. *Anal Bioanal Chem* 2003; 376: 1247-54.

Gilder JR, Doom TE, Inman K, Krane DE. Run-specific limits of detection and quantitation for STR-based DNA testing. *J Forensic Sci* 2007; 52: 97-101.

Bacher U, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007; 92: 744-52.

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937-51.

Huret JL, Ahmad M, Arsaban M, Bernheim A, Cigna J, Desangles F, Guignard JC, Jacquemot-Perbal MC, Labarussias M, Leberre V, Malo A, Morel-Pair C, Mossafa H, Potier JC, Texier G, Viguié F, Yau Chun Wan-Senon S, Zasadzinski A, Dessen P. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(Database issue): D920-4.

Kozu T, Miyoshi H, Shimizu K, Maseki N, Kaneko Y, Asou H, Kamada N, Ohki M. Junctions of the AML1/MTG8(ETO) fusion are constant in t(8;21) acute myeloid leukemia detected by reverse transcription polymerase chain reaction. *Blood* 1993; 82: 1270-6.

Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK; National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010; 116: 354-65.

Studel C, Wermke M, Schaich M, Schäkel U, Illmer T, Ehninger G, Thiede C. Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 37: 237-51.

van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Díaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. Standardized RTPCR 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* 1999; 13: 1901-28.

BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN / GERMANY
Telefon +49 351 8838 400
Faks +49 351 8838 403
support@biotype.de
www.biotype.de