



Mentype[®] AMLplex^{QS}

PCR Amplification Kit

Gebrauchsanweisung

**Nachweis chromosomaler Aberrationen der
Akuten Myeloischen Leukämie**

In-Vitro-Diagnostikum



AMLIFU01v7de
Juli 2021



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



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
D-01109 DRESDEN
GERMANY

Made in Germany

AMLIFU01v7de

Die Biotype GmbH entwickelt, produziert und vertreibt PCR-basierte Anwendungen für die medizinische Diagnostik.

Unsere Mentype® Test Kits garantieren höchste Qualitätsstandards.

Für Informationen und Anregungen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung. Kontaktieren Sie uns oder besuchen Sie unsere Homepage www.biotype.de.

Inhaltsverzeichnis

1. Bestimmungsgemäße Verwendung	5
2. Hintergrundinformationen	5
3. Produktbeschreibung Mentype® AMLplex^{QS}	5
3.1 Instrumente	7
3.2 Probentyp	7
4. Warnungen und Sicherheitshinweise	8
4.1 Qualitätssicherung	8
5. Mitgelieferte Materialien	9
5.1 Kit Inhalt	9
5.2 Bestellinformation	9
5.3 Zusätzlich benötigte Reagenzien und Ausstattung (nicht im Kit enthalten)	10
6. Lagerung	11
7. Arbeitsablauf Mentype® AMLplex^{QS}	12
7.1 Probenvorbereitung und cDNA-Einsatzvolumen	12
7.1.1 RNA Isolation	12
7.1.2 Umschreibung der RNA in cDNA	12
7.1.3 Einsatz der Template cDNA	12
7.2 Ansetzen des Mastermixes	13
7.2.1 Positivkontrolle	13
7.2.2 Negativkontrolle	14
7.3 Reaktionsvolumen	15
8. PCR Programm und Amplifikation	16
9. Kapillargelelektrophorese	17
9.1 Vorbereitung der PCR-Produkte	17
9.2 Fragmentlängenanalyse	17
10. Datenauswertung	19
10.1 Software und Auswertevorlagen	19
10.2 Vorgehensweise bei der Datenauswertung	20
10.2.1 Allgemeine Mindestanforderungen bei der Datenauswertung	20
10.2.2 Prüfung des Längenstandards DNA Size Standard 550 (BTO)	21
10.2.3 Prüfung der Allelleiter/Allelic Ladder	21
10.2.4 Prüfung der Mentype® AMLplex^{QS} Control cDNA Kasumi 1	24
10.2.5 Prüfung der Negativkontrolle	24
10.2.6 Auswertung der Probedaten	25
11. Troubleshooting	27
11.1 Detektionslimit	27
11.2 Überstrahlungen (Pull-up Peaks)	27
11.3 Template-unabhängige Anheftung von Nukleotiden	27
11.4 Artefakte	28
11.5 Einfluss des Polymertyps	28

12. Bestellinformationen	29
13. Referenzen	30
14. Marken und Haftungsausschluss	31
15. Symbole	32
Verifizierung und Validierung der Mentype® AMLplex^{QS} PCR-Amplifikationskits	33
A Analytische Validierung	33
A a) Festlegung der Standardreaktion und chargenspezifischer Toleranzen	33
A b) Testung der Genauigkeit der Messung	33
A c) Testung der analytischen Spezifität	34
A c) a) Testung der analytischen Spezifität anhand negativ vortypisierter cDNAs	34
A c) b) Testung der analytischen Spezifität anhand positiv vortypisierter cDNA	34
A d) Testung der analytischen Sensitivität	35
A e) Testung verschiedener PCR-Thermocycler	35
A f) Testung des Einflusses verschiedener Annealingtemperaturen in der PCR	35
A g) Testung verschiedener PCR-Pufferchargen	36
A h) Haltbarkeit nach Anbruch	36
B Klinische Leistungsdaten	37
B a) Probenahme, ethische und regulatorische Aspekte	37
B b) Vergleichstestung	37
B c) DNA-Extraktion und Aufreinigung	37
B d) Ergebnisse	37
B e) Literatur zu den Biomarkern und deren DNA-Sequenzen	39

Mentype® **AMLplex**^{QS}

1. Bestimmungsgemäße Verwendung

Das Kit Mentype® **AMLplex**^{QS} ist zum qualitativen Nachweis von 34 Gentranskriptvarianten bestimmt, welche bei bestimmten Subtypen der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) durch chromosomale Translokationen (somatische Mutationen) unter Beteiligung von 11 verschiedenen Genfusionen entstehen können.

Mentype® **AMLplex**^{QS} Anwendungen sind ausschließlich für den beruflichen Gebrauch in spezialisierten Laboratorien bestimmt. Das Personal sollte für die Techniken der PCR und der Anwendung von In-vitro-Diagnostika geschult sein.

2. Hintergrundinformationen

Der Nachweis spezifischer chromosomaler Aberrationen ist von großer prognostischer Bedeutung und daher unerlässlich für die Diagnostik akuter Leukämien. Die Identifikation der spezifischen genetischen Translokationen erlaubt die Klassifizierung der Subtypen der Leukämie und unterstützt somit die risikoadaptierte Therapie der Patienten.

Das Mentype® **AMLplex**^{QS} Kit erlaubt die robuste, in der Routinediagnostik leicht durchzuführende, Identifizierung therapierelevanter chromosomaler Aberrationen, die der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) zu Grunde liegen.

3. Produktbeschreibung Mentype® **AMLplex**^{QS}

Der Mentype® **AMLplex**^{QS} identifiziert in einem Multiparameteransatz 34 Transkriptvarianten der folgenden Fusionsgene: RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL, PICALM-MLLT10, CBFβ-MYH11, DEK-NUP214, KMT2A-MLLT4, KMT2A-MLLT3, KMT2A-ELL, KMT2A-PTD, NPM1-MLF1 und PML-RARA (vgl. Tabelle 1).

Die Ergebnisse des Mentype® **AMLplex**^{QS} sind durch zwei interne Kontrollen gesichert. Die interne PCR-Kontrolle (Quality Sensor "QS-Control") zeigt den Erfolg der Amplifikationsreaktion an; eine "cDNA Kontrolle" (ABL-Control) ist dem Kit beigelegt, um die Qualität der eingesetzten cDNA abzubilden.

Bei diesem Test handelt es sich um eine Fragmentlängenanalyse mittels Kapillargelelektrophorese. Die Primer sind mit den Fluoreszenzfarbstoffen **6-FAM**, **BTG** oder **BTY** markiert.

Tabelle 1 Genfusionen und Transkriptvarianten, welche mit Mentype® **AMLplex^{QS}** nachgewiesen werden können

Genefusion	Chromosomale Aberration	Variante
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 Instrumente

Die Mentype® **AMLplex^{QS}** Kits wurden auf folgenden PCR Cyclern verifiziert und validiert:

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

Die Kits wurden auf folgenden Kapillargelelektrophoresesytemen unter Nutzung von POP-4™ (Applied Biosystems™) und 36 cm Kapillarlänge verifiziert und validiert, die Nutzung von POP-7™ wurde verifiziert:

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

Die Datenauswertung wurde mit folgenden Softwareversionen verifiziert:

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

Die Anwendung der Mentype® **AMLplex^{QS}** Kits auf anderen Instrumenten oder mit anderer Software als den oben genannten muss durch den Anwender eigenverantwortlich validiert und verifiziert werden.

3.2 Probenotyp

Mentype® **AMLplex^{QS}** wurden mit cDNA validiert, welche aus RNA umgeschrieben wurde, die aus Citrat-Vollblut isoliert wurde.

Das Produkt Mentype® **AMLplex^{QS}** ist auf einen Einsatz von 1 µL cDNA validiert, diese wird aus 1 µg RNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µL umgeschrieben. Der Einsatz von größeren cDNA Mengen muss vom Anwender validiert werden.

4. Warnungen und Sicherheitshinweise

Bitte beachten Sie die Sicherheitsdatenblätter (SDS) der Biotype Produkte, die wir Ihnen gerne auf Nachfrage zusenden (support@biotype.de). Für Sicherheitsdatenblätter von Reagenzien, die nicht im Testkit enthalten sind, kontaktieren Sie bitte den jeweiligen Hersteller.

Lesen Sie die Gebrauchsanweisung sorgfältig durch, bevor Sie das Produkt anwenden.

Prüfen Sie nach Erhalt das Produkt und seine Komponenten auf Vollständigkeit in Bezug auf Anzahl, Typ und Abfüllung (siehe Kapitel 5.1, Kit Inhalt), richtige Kennzeichnung, gefrorenen Zustand der Reagenzien und Unversehrtheit der Reagenzienverpackungen.

Tragen Sie bei Benutzung der Assays Handschuhe, einen Laborkittel sowie ggf. einen Augenschutz.

Vermeiden Sie Nuklease (DNase / RNase) Kontamination der Proben durch Verwendung von DNase / RNase-freie Einwegpipettenspitzen mit aerosol-absorbierenden Filtern.

Verwenden Sie getrennte Arbeitsbereiche für Probenvorbereitung (prä-PCR), Mastermixpräparation sowie Probennachbereitung und Analyse (post-PCR). Lagern Sie die Positivkontrollen räumlich getrennt von den Kit-Komponenten.

Zusätzliche Kontrollen können nach den Richtlinien oder Anforderungen der lokalen, staatlichen und / oder föderalen Vorschriften oder Akkreditierungsorganisationen notwendig sein.

Verwenden Sie keine Komponenten des Kits, die ihr Verfallsdatum überschritten haben und mischen Sie keine Kitkomponenten zwischen verschiedenen Kitchargen.

Verwerfen Sie Proben- und Testabfälle gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen.

Gültig bis Kitcharge LEUK01095 (Reaction Mix A Charge CH2001597)

Folgender potenziell gefährliche Stoff ist in diesem Testkit enthalten:

Tabelle 2 Potenziell gefährliche Bestandteile der Mentype® AMLplex^{QS} Kits

Kitkomponente	Chemikalie	Gefahr
Reaction Mix A	Natriumazid NaN_3	Giftig beim Verschlucken, entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase

4.1 Qualitätssicherung

Der gesamte Inhalt des Testkits wird einer intensiven Qualitätssicherung durch die Biotype GmbH unterzogen. Die Qualität der Testkits wird kontinuierlich überprüft, um die uneingeschränkte Verwendbarkeit zu belegen. Bitte kontaktieren Sie uns per Mail an support@biotype.de in allen Fragen zur Qualitätssicherung.

5. Mitgelieferte Materialien

5.1 Kit Inhalt

Die Mentype® **AMLplex**^{QS} Kits enthalten die folgenden Komponenten ausreichend für die Durchführung von 25, 100 oder 400 Reaktionen.

Tabelle 3 Packungsgrößen und enthaltene Komponenten der Mentype® **AMLplex**^{QS} Kits

Kit-Komponente	Reagenz	Volumen pro Packungsgröße		
		25 Rkt.	100 Rkt.	400 Rkt.
Nuclease-Free Water	Nuklease-freies Wasser	1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Reaktionsmix A	250 µL	500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® AMLplex ^{QS} Primer Mix	Primermix	63 µL	250 µL	4 x 250 µL
Multi Taq2 DNA Polymerase	DNA Polymerase	10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Control cDNA Kasumi 1	Kontroll cDNA	10 µL	10 µL	10 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Allelic Ladder	Alleleiter	25 µL	25 µL	4 x 25 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Größenstandard	13 µL	50 µL	200 µL

Kitkomponenten aus verschiedenen Kitchargen dürfen nicht vermischt werden. Eine Übersicht über die Chargennummern finden Sie auf dem Etikett an der Innenseite des Boxdeckels. Das Aliquotieren der Kitkomponenten in andere Reaktionsgefäße ist nicht gestattet.

5.2 Bestellinformation

Richten Sie Ihre schriftliche Bestellung bitte per Mail an sales@biotype.de. Die Bestellung muss die Bestellnummern entsprechend der Tabelle 4 und Tabelle 16, Seite 29, enthalten.

Hinweis: Bitte beachten Sie, dass die Packungsgröße 10 Reaktionen nicht mehr verkauft wird.

Tabelle 4 Bestellnummern der Mentype® **AMLplex**^{QS} Kits

Produkt	Packungsgröße	Best. Nr.
Mentype® AMLplex ^{QS}	25 Reaktionen	45-31220-0025
Mentype® AMLplex ^{QS}	100 Reaktionen	45-31220-0100
Mentype® AMLplex ^{QS}	400 Reaktionen	45-31220-0400

5.3 Zusätzlich benötigte Reagenzien und Ausstattung (nicht im Kit enthalten)

Zur initialen Kalibrierung des Kapillargelelektrophoresegerätes auf die spezifischen Fluoreszenz-Farbstoffe des Mentype® **AMLplex^{QS}** Kits, muss eine spektrale Kalibrierung mit folgender Reagenz der Firma Biotype GmbH erfolgen (Tabelle 5):

Tabelle 5 Zusätzlich benötigte Reagenzien der Biotype GmbH

Reagenz	Anwendung	Packungsgröße	Best. Nr.
Matrix Standard BT5 single	Spektrale Kalibrierung des Kapillargelelektrophoresesystems (eine Kapillare)	5 x 25 µL	00-10411-0025
Matrix Standard BT5 multi	Spektrale Kalibrierung des Kapillargelelektrophoresesystems (mehrere Kapillaren)	25 µL	00-10421-0025
Matrix Standard BT5 multi	Spektrale Kalibrierung des Kapillargelelektrophoresesystems (mehrere Kapillaren)	2 x 25 µL	00-10421-0050

Zur Durchführung des Kits werden folgende allgemeine Materialien und Instrumente benötigt:

- Tischzentrifuge mit einem Rotor für 2 mL Reaktionsgefäße
- 96-Well-Reaktionsplatten oder 0,2 mL Reaktionsröhrchen, bei Nutzung von 96-Well-Reaktionsplatten geeignete Deckel oder Folien, eine Zentrifuge mit Rotor für Mikroliterplatten
- Vortex-Mixer, geeignet für 96-Well-Reaktionsplatten oder 0,2 mL Reaktionsröhrchen
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern (Einweg)
- Puderfreie Einweghandschuhe
- Geeignetes RNA-Isolations-Kit (vgl. Kapitel 7.1.1, RNA Isolation)
- Geeignetes Instrument zur quantitativen Vermessung der RNA-Konzentration nach Isolation und Aufreinigung (vgl. Kapitel 7.1.1, RNA Isolation)
- Geeignetes Kit zur Umschreibung von RNA in cDNA (vgl. 7.1.2, Umschreibung der RNA in cDNA)
- Eisblock zur kurzzeitigen Lagerung der Polymerase
- Geeigneter PCR Cycler (vgl. Kapitel 3.1, Instrumente)
- Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems™)
- Reagenzien und Verbrauchsmaterialien des Kapillargelelektrophoresesystems
- Geeignetes Kapillargelelektrophorese Instrument (vgl. Kapitel 3.1, Instrumente)

Hinweis: Stellen Sie sicher, dass alle Geräte nach den Herstellervorgaben installiert, gewartet und kalibriert sind. Vergewissern Sie sich, dass alle Reagenzien zum Betreiben des jeweiligen PCR und Kapillargelelektrophorese Instrumentes vorhanden sind (siehe Gebrauchsanweisung des jeweiligen Geräteherstellers).

6. Lagerung

Die Versendung der Mentype® **AMLplex^{QS}** Kits erfolgt auf Trockeneis. Die Bestandteile des Kits treffen gefroren ein. Sollten eine oder mehrere Komponenten nach dem Empfang nicht eingefroren sein oder wurden die Tubes während des Transports beschädigt, wenden Sie sich für weitere Unterstützung an die Biotype GmbH (support@biotype.de).

Die Lagerung der Komponenten muss bei -25 °C bis -15 °C erfolgen. Die Controll-cDNA und die post-PCR Reagenzien (Allelic Ladder und DNA Size Standard) sollten getrennt von den PCR Reagenzien gelagert werden.

Häufiges Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden. Die maximale Anzahl von 20 Tau-Frier-Zyklen darf nicht überschritten werden.

Die Mentype® **AMLplex^{QS}** Kits müssen lichtgeschützt aufbewahrt werden.

Die Haltbarkeit des Testkits ist auf dem Verpackungsetikett angegeben.

7. Arbeitsablauf Mentype® AMLplex^{QS}

7.1 Probenvorbereitung und cDNA-Einsatzvolumen

7.1.1 RNA Isolation

Die Qualität der isolierten RNA hat entscheidenden Einfluss auf die Leistung und Qualität des gesamten Testsystems. Es muss sichergestellt werden, dass das für die RNA-Isolation verwendete System mit der PCR-Technologie kompatibel ist.

Die folgenden Kits wurden zur RNA-Isolation getestet und sind zur Anwendung geeignet:

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

Die Anwendung alternativer RNA-Isolations-Kits muss durch den Anwender eigenverantwortlich validiert werden.

Hinweis: Für akkurate Ergebnisse ist die RNA Quantifizierung erforderlich (z. B. durch UV/VIS-spektroskopische RNA-Quantifizierung bei A260 nm und Qualitätsbestimmung mittels A260 / A280 Verhältnis, welches zwischen 1,7 und 2,0 liegen sollte).

7.1.2 Umschreibung der RNA in cDNA

Nach erfolgter Isolation und Quantifizierung der RNA, erfolgt die Umschreibung in cDNA mit Hilfe kommerziell erhältlicher Kits. Ein RNA Einsatz von 1 µg in einen Reaktionsansatz von 20 µL Umschreibereaktion wurde validiert.

Die folgenden Kits wurden zur Umschreibung getestet und sind zur Anwendung geeignet:

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

Die Anwendung alternativer Umschreibekits muss vom Anwender eigenverantwortlich validiert werden.

7.1.3 Einsatz der Template cDNA

Das Kit Mentype® AMLplex^{QS} wurde auf den Einsatz von 1 µL cDNA (unverdünnt) optimiert, welche wie unter 7.1.2 beschrieben vorbereitet wurde.

Die Menge des cDNA-Templates kann im Falle von kritischen Patientenproben erhöht werden. Maximal sollte 1/10 Volumen der RT-Reaktion eingesetzt werden. Im Reaktionsansatz des Mentype® AMLplex^{QS} Kits ist das Volumen an nuklease-freiem Wasser so zu korrigieren, dass das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes immer 25 µL beträgt. Dieses Vorgehen muss vom Anwender eigenverantwortlich validiert werden.

7.2 Ansetzen des Mastermixes

Alle Reagenzien sollten vor dem Ansetzen des Mastermixes gut gemischt (vortexen) und kurz zentrifugiert werden (ca. 10 s). Lagern Sie die Multi Taq2 DNA Polymerase während der Handhabung auf einem Eisblock.

Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes muss immer 25 μL betragen.

Berücksichtigen Sie bei der Anzahl der anzusetzenden PCR-Reaktionen die Positiv- und Negativkontrollen. Fügen Sie der Gesamtanzahl ein oder zwei Reaktionen hinzu, um Pipettierfehler zu kompensieren.

Die folgende Übersicht zeigt die Volumina der eingesetzten Kitbestandteile mit 1,0 μL Probenvolumen (Template-cDNA) und einem Reaktionsvolumen von 25 μL .

Tabelle 6 Mastermix-Ansatz für eine Reaktion Mentype® **AMLplex**^{QS} bei Nutzung von 1 μL cDNA

Komponente	Volumen pro PCR Ansatz
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
Gesamtvolumen des Mastermixes	24,0 μL
Template cDNA	1,0 μL

* enthält Mg^{2+} , dNTPs, BSA

7.2.1 Positivkontrolle

Verdünnen Sie die im Kit enthaltene Positivkontrolle Control cDNA Kasumi 1 zunächst mit nuklease-freiem Wasser auf 250 ng/ μL (1:2, z. B. 1 μL Control cDNA Kasumi 1 + 1 μL Nuclease-Free Water).

Für die Positivkontrolle verwenden Sie anstatt Template-cDNA 1 μL der verdünnten Positivkontrolle Control cDNA Kasumi 1. Pipettieren Sie die Kontroll-cDNA anstelle der Template-cDNA in die Reaktionsgefäße mit dem vorgelegten PCR Mastermix.

Die folgende Übersicht zeigt die Volumina der eingesetzten Kitbestandteile mit 1 μL Kontroll-cDNA und einem Reaktionsvolumen von 25 μL .

Tabelle 7 Mastermix-Ansatz für eine Reaktion Mentype® **AMLplex**^{QS} unter Nutzung von 1 µL Positivkontroll-Probe

Komponente	Volumen pro PCR Ansatz
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
Gesamtvolumen des Mastermixes	24,0 µL
Verdünnte Mentype® AMLplex ^{QS} Control cDNA Kasumi 1	1,0 µL

* enthält Mg²⁺, dNTPs, BSA

7.2.2 Negativkontrolle

Als Negativkontrolle (No Template Control) pipettieren Sie 1 µL nuklease-freies Wasser anstelle der Template-cDNA in die Reaktionsgefäße mit dem vorgelegten PCR Mastermix.

Die folgende Übersicht zeigt die Volumina der eingesetzten Kitbestandteile mit 1 µL „Nuclease-Free Water“ und einem Reaktionsvolumen von 25 µL.

Tabelle 8 Mastermix-Ansatz der Negativkontrolle für eine Reaktion Mentype® **AMLplex**^{QS}

Komponente	Volumen pro PCR Ansatz
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
Gesamtvolumen des Mastermixes	24,0 µL
Negativkontrolle nuklease-freies Wasser	1,0 µL

* enthält Mg²⁺, dNTPs, BSA

Zusätzlich kann eine bereits bekannte, auf die nachweisbaren Genfusionen und Translokationen negative cDNA als negative Kontrollprobe mitgeführt werden. Diese ist wie eine normale Probe zu prozessieren und in die PCR als extra Reaktion einzusetzen.

7.3 Reaktionsvolumen

Pipettieren Sie 24 μL des PCR Mastermixes in die Reaktionsgefäße oder in die Multiwellplatte. Fügen Sie dann 1 μL der cDNA oder 1 μL Positiv- bzw. Negativkontrolle dazu.

Nach dem Pipettieren müssen die Reaktionsgefäße bzw. die Multiwellplatten verschlossen werden. Mischen und zentrifugieren Sie die Reaktionsansätze kurz und geben Sie diese anschließend zur Amplifikation in den PCR-Cycler.

8. PCR Programm und Amplifikation

Um die Multi Taq 2 DNA Polymerase zu aktivieren und die Bildung von unspezifischen Amplifikationsprodukten zu unterdrücken, sollte unbedingt ein „**hot start**“ durchgeführt werden.

Um die optimale Anzahl der benötigten PCR Zyklen zu ermitteln, kann die interne ABL-Kontrolle als Referenz verwendet werden. Im Resultat sollte die Peakhöhe den spezifizierten Messbereich des Gerätes nicht überschreiten (z. B. 500 bis 5 000 RFU am ABI 3130).

Aufgrund zu geringer cDNA-Konzentration kann es zu statistischen Ausfällen (Allelic Dropouts) und unausgewogenen Peakhöhen kommen. Mit zunehmender Zyklenzahl steigt die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Amplifikationsprodukte.

Hinweis: Für eine optimale Kitbalance sollte die Heiz- und Kühlraten der PCR-Geräte auf 4 °C/s eingestellt werden.

Tabelle 9 PCR Amplifikationsparameter zur Durchführung von Mentype® **AMLplex^{QS}**

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
96 °C	4 min	1 x (hot start um die Multi Taq2 DNA Polymerase zu aktivieren)
96 °C	30 s	
61 °C	120 s	22-28 x
72 °C	75 s	
68 °C	10 min*	1 x
10 °C	∞	hold

* Sollten erhöhte Anteile an -Adenin Peaks (-1 bp) auftreten, kann dieser Schritt auf max. 60 min ausgedehnt werden.

Die Zyklenzahl ist abhängig von der eingesetzten cDNA-Menge und dem Expressionslevel der zu detektierenden Transkriptvariante. Es wurden Zyklenzahlen zwischen 22 und 28 getestet. Für Referenzproben aus Zellkulturmaterial (hohe Expressionsraten) empfehlen wir eine Reduzierung der PCR-Zyklen auf 22 Zyklen. Um die maximale Sensitivität (11.1 Detektionslimit) zu erreichen, empfehlen wir die maximale Zyklenzahl von 28 Zyklen zu verwenden.

9. Kapillargelelektrophorese

9.1 Vorbereitung der PCR-Produkte

Nach Beendigung der PCR entnehmen Sie die Proben dem Cycler und zentrifugieren diese kurz ab. Tauen Sie die Reagenzien Hi-Di™ Formamide (nicht im Kit enthalten) und DNA Size Standard 550 (BTO) auf, mischen Sie die Röhrchen kurz und zentrifugieren Sie diese kurz ab. Bereiten Sie den in Tabelle 10 beschriebenen Ansatz aus Hi-Di™ Formamid und dem DNA Size Standard 550 (BTO) vor, und fügen Sie dem Ansatz ein oder zwei Reaktionen hinzu, um Pipettierschwankungen zu kompensieren.

Tabelle 10 Ansatz der Denaturierungsmischung

Komponente	Volumen pro Reaktion
Hi-Di™ Formamide	12,0 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µL

Pipettieren Sie 12 µL der Denaturierungsmischung aus Hi-Di™ Formamid und DNA Size Standard 550 (BTO) in die entsprechende Anzahl an Wells einer PCR-Platte (geeignet für die Verwendung im Genetic Analyzer). Fügen Sie dann entweder 1 µL PCR-Produkt oder 1 µL Mentype® **AMLplex**^{QS} Allelic Ladder des pro Well hinzu. Verschließen Sie die PCR-Platte mit einer geeigneten Folie, vortexen und zentrifugieren Sie die Platte kurz ab. Entfernen Sie die Folie und verschließen Sie die Platte mit dem Septum des Geräteherstellers.

Hinweis: Die Alleleiter wird verwendet, um die während der Datenanalyse analysierten Fragmente korrekt zu bestimmen. In jedem Fragmentlängenanalyseauf muss die Alleleiter mindestens einmal analysiert werden, um eine erfolgreiche Datenanalyse sicherzustellen.

Hinweis: Die Kapillaren des Gelelektrophoresegeräts dürfen nicht trocken laufen. Wenn die Proben nicht alle Kapillarpositionen einnehmen, füllen Sie die zusätzlichen Wells der Platte mit 12 µL Hi-Di™ Formamid entsprechend der Kapillaranzahl auf.

Denaturieren Sie die vorbereiteten PCR-Produkte auf einem PCR-Cycler für 3 Minuten bei 95 °C, kühlen Sie die Proben im Cycler auf 4 °C ab. Zentrifugieren Sie die Proben vor der Fragmentlängenanalyse kurz ab.

9.2 Fragmentlängenanalyse

Allgemeine Anweisungen zum Analysegerät, der Matrixerstellung und der Anwendung der GeneMapper™ Software können der entsprechenden Anleitung *ABI PRISM® Genetic Analyzer User's Manual* entnommen werden.

Nachdem die spektrale Kalibrierung des Kapillargelelektrophoresegeräts mit dem Reagenz Matrix Standard BT5 (Biotype GmbH) erfolgreich durchgeführt wurde, erstellen Sie ein spezifisches Laufmodul (ABI 310, ABI 3130) oder Instrumentenprotokoll (ABI 3500) mit den folgenden Parametern:

Tabelle 11 Spezifische Laufparameter zur Fragmentlängenanalyse des Mentype® **AMLplex**^{QS}

	ABI 310	ABI 3130	ABI 3500
Injections Voltage [kV]	15.0	3.0	3.0
Run Time	28 min	1560 s	1560 s
Injection Time [s]	5	10	8

Abweichend von den in Tabelle 11 angegebenen Werten kann die Laufzeit angepasst werden, um alle Fragmente (60-550 bp) des DNA Size Standard 550 (BTO) zu analysieren.

Hinweis: Befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers des Kapillargel-Elektrophoresegeräts, um die spezifischen Laufparameter einzustellen.

Hinweis: Beachten Sie auch die zusätzlichen Informationen zur Kalibrierung und Anwendung der Mentype®-Produkte auf Kapillargel-Elektrophoresegeräten. Diese sind auf Anfrage über support@biotype.de bei Biotype GmbH erhältlich.

10. Datenauswertung

10.1 Software und Auswertevorlagen

Die Datenauswertung erfolgt mit der Software GeneMapper™ ID oder GeneMapper™ ID-X (Applied Biosystems™).

Zur einfachen Datenauswertung bietet die Firma Biotype GmbH unter www.biotype.de vorgefertigte Einstellungen (Tabelle 12) an, welche in die entsprechende GeneMapper™ Version importiert werden können und die manuelle Erstellung der Analyseparameter ersetzt.

Hinweis: Der Import und die Allelzuordnung mit Hilfe der angebotenen Auswertevorlagen kann nur für die GeneMapper™ ID/ID-X Software garantiert werden. Sollten Sie GeneMapper™ nutzen, können Probleme beim Import einiger Auswertevorlagen auftreten.

Hinweis: Die erhältlichen Vorlagen für Bins und Panel Set definieren die Fragmentlänge der einzelnen Fragmente. Durch leichte Unterschiede in der Performance verschiedener Kapillargelelektrophorese-Geräte kann es zu leichten Abweichungen zwischen den Geräten kommen. Eine spezifische Anpassung der Bins und Panels durch Biotype GmbH ist möglich, kontaktieren Sie uns hierzu bitte über support@biotype.de.

Tabelle 12 Übersicht über verfügbare Vorlagen zum Import in GeneMapper™ ID/ID-X

Vorlage	Name	
Panels	AMLplex_Panels_v2/v2x	Oder höhere Version
BinSets	AMLplex_Bins_v2/v2x	Oder höhere Version
Size Standard	SST-BTO_60-550bp	
Analysis Method	AMLplex_HID_310_200RFU	Empfohlen
	AMLplex_HID_3130_200RFU	Empfohlen
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Setting	Table for 10 Alleles	
	Table for 22 Alleles	

Sollte die Analysemethode manuell angelegt werden, so sind die folgenden Parameter zu wählen (Tabelle 13):

Tabelle 13 Parameter zur manuellen Erstellung einer Analysemethode in GeneMapper™ ID/ID-X

Parameter	Einstellung
Peak Detection Algorithm	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* Slope Thresholds: 0.0
Peak Quality	Heterozygote Balance: 0.0 Max expected alleles: 22

* Falls notwendig kann die Peak Window Size auf 11 pts verringert werden.

10.2 Vorgehensweise bei der Datenauswertung

10.2.1 Allgemeine Mindestanforderungen bei der Datenauswertung

Die fsa-Dateien der Kapillargelelektrophorese werden qualitativ ausgewertet, d. h. auf die Anwesenheit von Amplifikatpeaks geprüft. Hierbei gilt, dass ein Peak mindestens 200 RFU Höhe erreichen muss und dabei mindestens 3-mal so groß sein sollte wie das Grundrauschen der Basislinie. Diese Kriterien gelten für Kontrollpeaks (QS- und ABL-Control) ebenso wie für Peaks der Genfusionen.

Die einzige Ausnahme bildet der Größenstandard DNA Size Standard 550 (BTO), hier ist eine minimale Peakhöhe von 50 RFU zu erreichen.

10.2.2 Prüfung des Längenstandards DNA Size Standard 550 (BTO)

Die Ermittlung der genauen Fragmentlängen der amplifizierten Produkte ist abhängig von dem verwendeten DNA Längenstandard. Aufgrund der Komplexität einiger Loci sollten möglichst viele, gleichmäßig verteilte Referenzpunkte zur Längenbestimmung herangezogen werden. Hierzu verwenden Sie den DNA Size Standard 550 (BTO) (Abbildung 1) mit den Fragmentlängen 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 und 550 bp.

Prüfen Sie im Elektropherogramm (Kanal Orange) aller Proben, dass alle Allele des Größenstandards vorhanden sind, eine ausreichende Peakhöhe von mindestens 50 RFU besitzen und korrekt zugeordnet wurden (vgl. Abbildung 1).

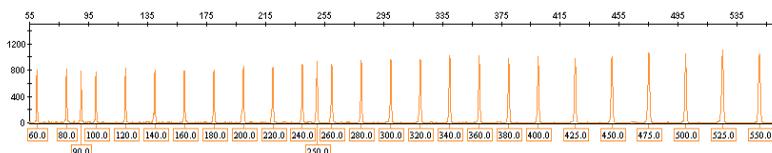


Abbildung 1 Elektropherogramm des DNA Size Standard 550 (BTO), analysiert auf ABI 3500, Software GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, y-Achse: 55-560 bp, x-Achse: 0-1 500 RFU

Hinweis: Sollten in den verschiedenen Proben nicht alle Fragmente des Größenstandards analysiert sein, kann es zu einer unzureichenden Auswertung der Allelleiter und Proben kommen. Prüfen Sie daher immer den Größenstandard auf die erfolgreiche Analyse.

10.2.3 Prüfung der Allelleiter/Alelic Ladder

Die Allelleiter enthält alle mit dem Mentype® **AMLplex^{QS}** nachweisbaren Fragmente (vgl. Tabelle 1 sowie Abbildung 2). Diese Fragmente müssen dementsprechend in der Allelleiter vorhanden sein und mit mindestens 200 RFU Höhe nachgewiesen werden. Die Fusionsgene sowie die zugehörigen Transkriptvarianten befinden sich immer in einem Farbkanal (Tabelle 14).

Tabelle 14 Übersicht über die Verteilung der Genfusionen auf die Farbkanäle

Blauer Farbkanal	Grüner Farbkanal	Gelber Farbkanal
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)	
QS und ABL Kontrolle		

Hinweis: Sollten bei Nutzung der Auswertetemplates (v. a. des Bins und Panels Set) nicht alle Fragmente der Allelleiter automatisch benannt werden, wenden Sie sich bitte an support@biotype.de, da eine Anpassung der Templates an Ihr Setting notwendig sein kann. In einem solchen Fall ist eine fehlende Zuordnung der Peaks in den Proben möglich.

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

Das Kit enthält die Positivkontrolle Mentype® AMLplex^{QS} Control cDNA Kasumi 1*, diese ist positiv für die Genfusion RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO).

Prüfen Sie, dass die Kontroll-Peaks QS-Control und ABL-Control mit ausreichender Höhe erscheinen. Prüfen Sie, dass der Peak für die Translokation RUNX1-RUNX1T1 mit ausreichender Höhe im Elektropherogramm erscheint (Abbildung 3). Prüfen Sie, dass keine unerwarteten Nebenprodukte im Elektropherogramm erscheinen.

*Die Zellkultur für die Erstellung der cDNA wurde bezogen von: DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany. Die Verwendung dieser cDNA ist ausschließlich für den Mentype® AMLplex^{QS} vorgesehen.

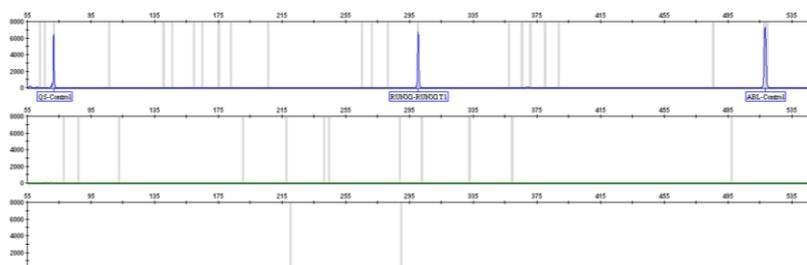


Abbildung 3 Elektropherogramm der Mentype® AMLplex^{QS} Control cDNA Kasumi 1, analysiert auf ABI 3500, GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, y-Achse 55-515 bp, x-Achse 0-8 000 RFU

10.2.5 Prüfung der Negativkontrolle

Prüfen Sie, dass keine für eine Translokation spezifischen Peaks größer als 200 RFU im Elektropherogramm (Kanal blau, grün, gelb) erscheinen.

No-Template Control: Prüfen Sie, dass nur der Kontroll-Peak QS-Control mit ausreichender Höhe erscheint, jedoch nicht der ABL-Control Peak (Abbildung 4).



Abbildung 4 Elektropherogramm einer No-Template Control, analysiert auf ABI 3500, GeneMapper ID-X 1.4, Template Files v3x, y-Achse 0-10 000 RFU, x-Achse 55-515 bp

Negative Kontrollprobe (nicht im Kit enthalten): Prüfen Sie, dass bei einer bekannten cDNA, welche für die nachweisbaren Genfusionen und Translokationen negativ ist, die Kontroll-Peaks QS-Control und ABL-Control mit ausreichender Höhe erscheinen (Abbildung 5).

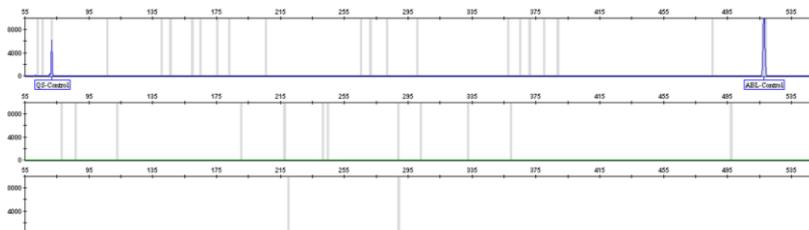


Abbildung 5 Elektropherogramm einer negativen Kontrollprobe, analysiert auf ABI 3500, GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, y-Achse 0-10 000 RFU, x-Achse 55-550 bp

10.2.6 Auswertung der Probandaten

Nach erfolgter Prüfung der Größenstandards, Allelleiter sowie der Kontrollproben erfolgt die Auswertung der Probandaten.

Hinweis: Der Mentype® **AMLplex^{QS}** ist ein rein qualitativer Test. Eine quantitative Auswertung z. B. im Rahmen einer MRD-Bestimmung ist ausdrücklich nicht möglich.

Bei Nutzung der Auswertevorlagen der Biotype GmbH und erfolgreicher Auswertung der Allelleiter des Laufes, werden die detektierten PCR-Fragmente automatisch benannt. Eine Übersicht über die Fragmentlängen der PCR-Produkte finden Sie in Tabelle 15.

Hinweis: Mentype® **AMLplex^{QS}** wurde auf POP-4™ validiert und zertifiziert. Die Verwendung eines anderen Polymers (z. B. POP-7™ oder POP-6™) kann das Laufverhalten der spezifischen PCR-Produkte verändern. Die Anpassung der Biotype Templates (Panels und BinSet) ist unter Umständen nötig. Bitte wenden Sie sich an unseren technischen Support (support@biotype.de). Außerdem wurde ein erhöhtes Hintergrundrauschen durch ein verändertes Verhalten von freien Fluoreszenzfarbstoffresten beobachtet.

Tabelle 15 Übersicht der Fragmentlängen der einzelnen Translokationen in der Alleleiter des Mentype® **AMLplex^{QS}**, ermittelt unter Nutzung von POP-4™; † für die Variante KMT2A-MLLT3_6A werden zwei Amplikons erwartet; * Aufgrund der variierenden Amplikonlänge des PML-RARA_bcr2 (ca. 173 bp) kann die Variante nicht automatisch zugeordnet werden, ist jedoch mit den Primern des Mentype® **AMLplex^{QS}** detektierbar

Panel/Translokation	Größe [bp]	Panel/Translokation	Größe [bp]
Blauer Kanal		Grüner Kanal	
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	Gelber Kanal	
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

Durch die vorher beschriebene Post-PCR Auswertung mit automatischer Allelzuordnung wird eine genaue und zuverlässige Unterscheidung der Fusionsgentranskripte und ihrer Varianten gewährleistet. Bitte überprüfen Sie die korrekte Zuordnung der Allele in der Allelleiter in jedem Lauf.

11.1 Detektionslimit

In Versuchen mit Plasmiden wurde bei einer Zyklenzahl von 25 Zyklen ein Detektionslimit von ≤ 1.000 Kopien für 32 von 34 Transkriptvarianten ermittelt. Die Transkriptvarianten CFBF-MYH11_Type C und KMT2A-MLLT4 (MLL-AF6) weichen hiervon ab. Bei einer Zyklenzahl von 28 können 1.000 Kopien CFBF-MYH11_Type C und 10.000 Kopien KMT2A-MLLT4 (MLL-AF6) bestimmt werden. Liegen die angegebenen Kopienzahlen vor, können Peakhöhen von > 200 RFU erreicht werden.

Es handelt sich bei dieser Anwendung um ein PCR-basiertes Screening-Tool, das für die Subtypen Klassifizierung der AML entwickelt, validiert und zertifiziert wurde. Diese Anwendung ist nicht für die Quantifizierung oder das Monitoring Minimaler Resterkrankung (MRD) geeignet.

11.2 Überstrahlungen (Pull-up Peaks)

Es kann zu Überstrahlungen zwischen den Farbpanels kommen, wenn eine ungeeignete Matrix für die Analyse verwendet wurde oder die Peakhöhen des PCR Produktes außerhalb des linearen Detektionsbereiches des Gerätes liegen. Diese erscheinen an der gleichen Position wie spezifische Peaks in anderen Farbpanels (in der Regel mit niedrigeren Signalintensitäten).

Hinweis: Wenn nötig, verdünnen Sie die PCR Produkte vor der Kapillargelelektrophorese um eindeutig auswertbare Ergebnisse zu erhalten. Bei Überstrahlungen trotz optimaler Fluoreszenzhöhen, sollte die Matrix erneuert werden.

11.3 Template-unabhängige Anheftung von Nukleotiden

Die Multi Taq 2 DNA Polymerase hängt aufgrund ihrer terminalen Transferase-Aktivität bevorzugt ein Adenosin an das 3'-Ende des amplifizierten DNA-Fragments an. Wenn dem PCR-System nicht genügend Zeit für die Extension zur Verfügung steht oder wenn die Primersequenzen die Extension nicht begünstigen, findet diese Anheftung nicht statt. Dieses Artefakt ist durch das Auftreten eines um eine Base verkürzten Fragments (-1 bp Peak) erkennbar. Alle Biotype Primer sind so gestaltet, dass diese Artefaktbildung minimiert wird. Zusätzlich wird die Bildung des Artefakts durch den abschließenden Extensionsschritt im PCR-Protokoll (68 °C für 10 min) reduziert. Die Peakhöhe des Artefakts nimmt bei hohen cDNA-Mengen zu. Zur Bewertung der Peaks sollte jedes Analyselabor hierfür eigene Grenzwerte festlegen.

11.4 Artefakte

Die Raumtemperatur kann das Laufverhalten der PCR-Produkte an Kapillargeräten stark beeinflussen und bei zu geringer Temperatur zum Auftreten von Schultern oder Doppelpicks (Split Peaks) führen. Außerdem kann die automatische Allelzuordnung beeinträchtigt sein. Sollten diese Effekte beobachtet werden, empfehlen wir eine erneute Injektion der Proben eventuell auch mit mehreren Allelleitern pro Run. Bitte achten Sie darauf, dass die vom Gerätehersteller empfohlene Arbeitstemperatur eingehalten wird. Optimal sind stabile Raumtemperaturen > 22 °C.

11.5 Einfluss des Polymertyps

Mentype® **AMLplex^{QS}** wurde auf POP-4™ validiert und zertifiziert. Die Verwendung eines anderen Polymers (z. B. POP-7™ oder POP-6™) kann das Laufverhalten der spezifischen PCR-Produkte verändern. Die Anpassung der Biotype Templates (Panels und BinSet) ist unter Umständen nötig. Bitte wenden Sie sich an unseren technischen Support (support@biotype.de). Außerdem wurde ein erhöhtes Hintergrundrauschen durch ein verändertes Verhalten von freien Fluoreszenzfarbstoffresten beobachtet.

12. Bestellinformationen

Tabelle 16 Detaillierte Bestellinformationen der Mentype® **AMLplex^{QS}** Kits

Kit	Packungsgröße	Bestellnummer
Mentype® AMLplex^{QS}	25 Reaktionen	45-31220-0025
Mentype® AMLplex^{QS}	100 Reaktionen	45-31220-0100
Mentype® AMLplex^{QS}	400 Reaktionen	45-31220-0400

13. Referenzen

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.

14. Marken und Haftungsausschluss

In diesem Dokument verwendete eingetragene Namen, Marken usw. sind, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, nicht als ungeschützt anzusehen: Biotype[®], Mentype[®] (Biotype GmbH); ABI PRISM[®], GeneMapper[™], Hi-Di[™] Formamide, POP-4[™], POP-6[™], POP-7[™], Applied Biosystems[™] (Thermo Fisher Scientific Inc.); FAM[™] (Life Technologies Ltd.).

Mentype[®] **AMLplex^{QS}** Kits sind CE-gekennzeichnete Kits gemäß der europäischen Richtlinie 98/79/EG für In-vitro-Diagnostika. Die Kits sind nicht als In-vitro-Diagnostika außerhalb dieses regulatorischen Bereichs erhältlich.

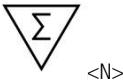
15. Symbole



Hersteller



Chargenbezeichnung



Ausreichend für <N> Tests



Hinweis auf eIFU



Verwendbar bis



Temperaturbegrenzung



Artikelnummer



In-vitro-Diagnostikum



Vor Sonnenlicht schützen



Trocken aufbewahren

Verifizierung und Validierung der Mentype® AMLplex^{QS} PCR-Amplifikationskits

A Analytische Validierung

A a) Festlegung der Standardreaktion und chargenspezifischer Toleranzen

Zielsetzung: Festlegung der Standardreaktion und der chargenspezifischen Toleranzen in Bezug auf die absoluten Signalhöhen (RFU), die Ausgewogenheit der Signalhöhen der Multiplex-PCR und der Basislinie. Zusätzlich werden anhand der Ergebnisse die testspezifischen Geräteeinstellungen für die Genotypisierung mittels Kapillargelelektrophorese (Bins und Panels) unter Verwendung der Auswertevorlagen der DNA-Sequenzierautomaten festgelegt.

Methodik: Dem Testkit ist die Kontroll-cDNA der Zelllinie KASUMI-1 (ACC220, Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) beigelegt, welche die Genfusion RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO) mit der chromosomalen Aberration t(8; 21) (q22; q22) enthält [7]. Zusätzlich wurde ein künstliches äquimolares Templategemisch aus Plasmiden, das 33 der 34 detektierbaren Varianten enthielt, verwendet. Die Standardreaktion erfolgte mit der Kontroll-cDNA in der Nennkonzentration von 250 ng pro PCR-Ansatz und 25 PCR-Zyklen. Das Templategemisch wurde so eingestellt, dass nach 25 PCR-Zyklen Signalhöhen im linearen Messbereich der verwendeten Analysegeräte erreicht wurden (max. 5000 RFU). Es erfolgte eine Vierfachbestimmung mit ebenfalls vier Blindwerten (no template control, NTC) ohne DNA.

Ergebnisse: Für die chargenspezifische Abmischung der PCR-Primer wurden folgenden Spezifikationen festgelegt: Unter Verwendung eines ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer wurden Signalhöhen von 1.000-4.000 RFU und unter Verwendung eines ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer wurden Signalhöhen von 1.000-5.000 RFU bei Nutzung des Templategemisches erzielt. Spezifische Signale werden ab einer Signalhöhe von 200 RFU detektiert. Im Skalierungsbereich wurden bei den Blindwerten keine unspezifischen Signale (freie Farbstoffe, Artefakte) > 200 RFU detektiert (Basislinie).

A b) Testung der Genauigkeit der Messung

Zielsetzung: Informationen zur Richtigkeit des Messverfahrens sowie eine ausreichend detaillierte Zusammenfassung der Daten, die es ermöglicht zu bewerten, ob die Mittel zur Feststellung der Richtigkeit angemessen sind. Richtigkeitsmessungen sind nur dann sowohl für quantitative als auch qualitative Tests einsetzbar, wenn eine Referenznorm oder –Methode verfügbar ist.

Methodik: Das Kit wird durch die regelmäßige Teilnahme an Ringversuchen validiert und in Bezug auf die richtige qualitative Aussage (Diagnostik) hin überprüft. Biotype nimmt seit dem 03.06.2013 regelmäßig an Ringversuchen des United Kingdom National Quality Assessment Schemes (UKNEQAS, www.ukneqas.org.uk) zur Detektion von BCR-ABL und AML Translokationen teil. Diese finden regelmäßig (2 x) pro Jahr statt und werden von der Behörde

ausgewertet. Die Ergebnisse (Performance Status) auch im Vergleich mit anderen Teilnehmern, werden nach Teilnahme versendet.

Ergebnisse: Bisheriger Performancestatus ist „Green“. Das Produkt ist nachweislich für den Nachweis von BCR-ABL Varianten und AML Translokationen geeignet und erreicht im Vergleich mit anderen molekulargenetischen Methoden die richtigen Ergebnisse (Qualitativ).

A c) Testung der analytischen Spezifität

A c) a) Testung der analytischen Spezifität anhand negativ vortypisierter cDNAs

Zielsetzung: Die Untersuchungen dienen dem Ausschluss falsch positiver Ergebnisse infolge Interferenz- und Kreuzreaktivität mit ausgewählten cDNAs von negativ vortypisierten Proben (Patienten und gesunde Spender).

Methodik: Es wurden 22 cDNAs getestet, die für die im Testkit nachzuweisenden Translokationsvarianten negativ vortypisiert wurden. Die eingesetzten Mengen sollten den Bereich der in der klinischen Praxis zu erwartenden Konzentrationen abdecken und betragen von 145 ng bis max. 934 ng cDNA pro PCR-Ansatz mit 25 Zyklen.

Ergebnisse: Im durch die Bins und Panels (Templates) festgelegten Allelbereich wurde keine Kreuzreaktivität (> 200 RFU) festgestellt. Das Messsignal für die interne cDNA-Kontrolle (ABL-Gen) betrug bei 21 cDNAs > 200 RFU, in einem Fall ca. 50 RFU. Der Grenzwert für die automatische Allelzuordnung wurde auf 200 RFU gesetzt.

A c) b) Testung der analytischen Spezifität anhand positiv vortypisierter cDNA

Zielsetzung: Die Untersuchungen dienen dem Ausschluss falsch positiver Ergebnisse infolge Interferenz- und Kreuzreaktivität der Primer mit ausgewählten cDNAs von positiv vortypisierten Patienten.

Methodik: Es wurden 20 cDNAs getestet, die für die im Testkit nachzuweisenden Translokationsvarianten positiv vortypisiert wurden. Die eingesetzte Menge wurde auf 250 ng cDNA pro PCR-Ansatz festgelegt. Das PCR-Programm wurde mit 25 Zyklen durchgeführt.

Ergebnisse: Alle vorbestimmten somatischen Mutationen konnten eindeutig nachgewiesen werden. Im Allelbereich wurde keine Kreuzreaktivität (> 50 RFU) festgestellt. Die Messsignale für die somatischen Mutationen und die interne cDNA-Kontrolle (ABL-Gen) betragen bei 16/20 Proben > 200 RFU und > 50 RFU bei 3/20 Proben. Eine Probe erreichte nur Werte unter 50 RFU, allerdings war die Fusionsgenvariante immer noch detektierbar. Der Grenzwert für die automatische Allelzuordnung wurde auf 200 RFU gesetzt.

A d) **Testung der analytischen Sensitivität**

Zielsetzung: Die Untersuchungen dienten der Bestimmung der analytischen Nachweisgrenze des Testes (Sensitivität).

Methodik: Es wurde eine Verdünnungsreihe mit 1 µg bis 31,25 ng Referenz-cDNA (Kasumi-1) in Vierfachbestimmung getestet. Das PCR-Programm wurde mit 25 Zyklen durchgeführt. Zusätzlich wurden für jede nachzuweisende Transkriptionsvariante, Verdünnungsreihen eines künstlich hergestellten Referenztemplates (Plasmide, GeneArt, Life Technologies) mit festgelegter Kopienzahl in Doppelbestimmung getestet.

Ergebnisse: Bis zu einer cDNA Konzentration von 62,5 ng konnten sowohl für die spezifische Translokation als auch für die ABL-Kontrolle Signalintensitäten > 200 RFU nachgewiesen werden. Bei 31,25 ng betrug die Signalintensität der spezifischen Variante > 200 RFU, die der ABL-Kontrolle > 50 RFU. Optimale Werte in Bezug auf den Messbereich des Kapillarsequenzierers wurden im Bereich von 150 ng – 250 ng erreicht. Die Messungen der Plasmidverdünnungen ergaben, dass für alle Translokationsvarianten eine Nachweisgrenze > 200 RFU von 100-1 000 Kopien erreicht werden kann.

A e) **Testung verschiedener PCR-Thermocycler**

Zielsetzung: PCR-Thermocycler unterschiedlicher Hersteller unterscheiden sich in ihren Spezifikationen. Insbesondere können unterschiedliche Heiz – und Kühlraten sowie unterschiedliche Temperaturregelungstechniken vorliegen.

Methodik: Testung der Standardreaktionen mit Kontroll-DNA in der Nennkonzentration von 250 ng wurden mit folgenden Thermocyclern in 4-fach Bestimmung mit gleichem Mastermix und 2 Blindproben ohne DNA durchgeführt: Thermocycler Eppendorf Mastercycler ep-S (Eppendorf AG, Hamburg), Applied Biosystems® GeneAmp 9700 mit Silberblock (Life Technology GmbH, Darmstadt), Applied Biosystems® GeneAmp 9700 mit Aluminiumblock (Life Technology GmbH, Darmstadt).

Ergebnisse: Auf allen Thermocyclertypen konnten korrekte Zuordnungen aller Amplifikate getroffen werden. Alle Fragmente des Templategemisches wurden erfolgreich amplifiziert.

A f) **Testung des Einflusses verschiedener Annealingtemperaturen in der PCR**

Zielsetzung: Zur Bestimmung der Robustheit der PCRs werden Temperaturschwankungen für den Primeranlagerungsschritt (Annealing) der Multiplex-PCR simuliert. Dieser Temperaturschritt ist kritisch für die Sensitivität und Spezifität der PCRs.

Methodik: Die kitspezifische Annealingtemperatur von 60 °C der Standardreaktion mit Kontroll-DNA in der Nennkonzentration von 250 ng wurde um ± 1 °C und ± 2 °C variiert. Es erfolgte eine 3-fache Bestimmung mit dem gleichen Mastermix.

Ergebnisse: Das Kit ist bei gerätetechnischen Schwankungen ± 1 °C um die ausgewiesene Annealingtemperatur stabil. Optimale Signalhöhen aller Systeme werden mit der Annealingtemperatur von 61 °C erreicht.

A g) Testung verschiedener PCR-Pufferchargen

Zielsetzung: Die Konzentrationsverhältnisse der Inhaltsstoffe des PCR-Puffers Reaktionsgemisch A (dNTPs, Ionenkonzentrationen, insbesondere Mg^{2+}) sind für Sensitivität, Spezifität und Ausgewogenheit der Signale in der Multiplex-PCR entscheidend. Deshalb wird die Robustheit des Tests gegenüber Chargenschwankungen des mitgelieferten PCR-Puffers getestet.

Methodik: Die Testung von 3 unabhängigen REM-A Chargen erfolgte in der Standardreaktion mit Kontroll-DNA der Nennkonzentration von 250 ng, sowie der Allelleiter und einer cDNA-Linie mit schwacher Expression (KMT2A-MLLT4 (MLL-AF6)).

Ergebnisse: Jede neu hergestellte Charge REM A wird mit dem Mentype® **AMLplex^{QS}** Amplifikations-Kit getestet. Dabei erfolgt eine Freigabe der REM A Charge nur, wenn die erzielten Ergebnisse mit dem Mentype® **AMLplex^{QS}** innerhalb der Spezifikation liegen.

A h) Haltbarkeit nach Anbruch

Zielsetzung: Die Stabilität der Reagenzien des PCR-Kits wurde nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen getestet.

Methodik: Die Kitreagenzien wurden einem 20-fachen Einfrier- und Auftauzyklus unterworfen. Das Einfrieren wurde mindestens für 1 h bei -20 °C durchgeführt. Aufgetaut wurde bei Raumtemperatur und die Reagenzien wurden vor Gebrauch durch Schütteln homogenisiert. Anschließend wurde eine Standardreaktion mit Kontroll-DNA der Nennkonzentration von 250 ng und zusätzlichen Blindwerten ohne DNA in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Bewertung erfolgte im Vergleich zu einer Standardreaktion ohne Einfrier- und Auftauzyklus.

Ergebnisse: Die Abweichung der gemittelten Peakhöhen im Vergleich zur Standardreaktion betrug maximal 20 % (insbesondere Signalverlust). Bei den Blindwerten wurden keine zusätzlichen Peaks > 50 RFU innerhalb des Skalierungsbereiches festgestellt.

B Klinische Leistungsdaten

B a) Probenahme, ethische und regulatorische Aspekte

Es wurde eine Leistungsbewertungsprüfung nach den §§ 20 bis 24 Medizinproduktegesetz (DE) durchgeführt. Die Befreiung von der Genehmigungspflicht für Medizinprodukte mit geringem Sicherheitsrisiko gemäß § 7 Verordnung über klinische Prüfungen von Medizinprodukten wurde vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte erteilt. Ein zustimmendes Votum der zuständigen Ethikkommission und Patienteneinverständniserklärungen lagen vor.

Es wurde venöses Vollblut von 297 Patienten und 10 gesunde Probanden verwendet.

B b) Vergleichstesting

Die primäre Zielgröße ist die Ermittlung diagnostischer Sensitivitäten und Spezifitäten im Vergleich zu den Referenzmethoden. Für eine Auswahl der Translokationen standen standardisierte zytogenetische Methoden (Karyotypisierung, FISH-Analysen) zur Verfügung [8]. Für Translokationen, die nicht zytogenetisch dargestellt werden konnten, wurden validierte und etablierte Monoplex-nested-PCR-Tests verwendet [9, 10].

B c) DNA-Extraktion und Aufreinigung

Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden aus heparinisierten Vollblut mononukleäre Zellen (MNC) gewonnen. Anschließend wurde unter Verwendung käuflicher mRNA-Extraktionskits Gesamt-mRNA gewonnen (RNeasy Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, DE). Diese wurde mit kommerziell erhältlichen Kits in cDNA umgeschrieben (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen GmbH, Hilden, DE). Die Qualität der cDNA wurde mittels Realtime-PCR geprüft (validierter In-House-Test). Die einzelnen Fusionsgene bzw. Mutationen wurden mit validierten Einzel-PCRs überprüft.

B d) Ergebnisse

Das Mentype® **AMLplex^{QS}** PCR-Amplifikationskit zeigte mit cDNA der 10 gesunden Probanden keine Mutationen. Diese Ergebnisse wurden bei den weiteren Ergebnisberechnungen nicht berücksichtigt. Anschließend wurden 297 Patientenproben untersucht. Davon konnten 5 Proben nicht ausgewertet werden (Kontrollsignal für ABL unter dem empfohlenen Schwellenwert). Von den restlichen 292 Proben wurden 199 im Vergleich zur Karyotypisierung, FISH und/oder Kontroll-PCR als richtig negativ erkannt. Von den richtig negativen Proben zeigten 56 im Karyogramm genetische Veränderungen (chromosomale Anomalien), welche nicht durch das Testkit erkannt werden können. Dies lässt sich damit erklären, da das Mentype® **AMLplex^{QS}** PCR-Amplifikationskit zwar die häufigsten Translokationen beinhaltet, allerdings nur ca. 37 % der bei AML häufig beobachteten genetischen Abnormalitäten abdeckt [8]. Die Einzelergebnisse der Vergleichstestungen sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Insgesamt konnte eine diagnostische Sensitivität von 94 % und eine diagnostische Spezifität von 99,5 % erzielt werden. Alle mittels Kontroll-PCR [9, 10] verifizierten zytogenetischen Befunde konnten eindeutig bestätigt werden.

Tabelle 17 Ergebniszusammenstellung der Leistungsbewertungsprüfung, * [8]

Gen-fusion	Biomarker		Prävalenz [%] *	Richtig Positiv	Auswertung der klinischen Leistungstestung (n=292)				Diagnostische Sensitivität [%]	Diagnostische Spezifität [%]
	Chromosomale Aberration	Variante			Richtig Negativ	Falsch Positiv	Falsch Negativ	Diagnostische Sensitivität [%]		
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	Partial Tandem Duplication	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	
Total			37	79	207	1	5	94.0	99.5	

B e) Literatur zu den Biomarkern und deren DNA-Sequenzen

Übersichtsreferate und Zitate der DNA-Datenbanken:

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.*

Ausgewählte Literatur zu 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.

Ausgewählte Literatur zu 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 thrombocythemic 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.

Ausgewählte Literatur zu 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.

Ausgewählte Literatur zu 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

Ausgewählte Literatur zu 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

Ausgewählte Literatur zu 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.

Ausgewählte Literatur zu MLL-AF9, t(9;11)(q22;q23):

Giugliano E, Rege-Cambrin G, Scaravaglio P, Serra A, Wlodarska 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, Schwarzwinger 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.

Ausgewählte Literatur zu 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.

Ausgewählte Literatur zu MLL-PTD, Partial Tandem Duplication:

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, Kolitz 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.

Ausgewählte Literatur zu 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.

Ausgewählte Literatur zu 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.

Weitere Referenzen

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.

Sgueglia 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.

Stedel 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

Tel. +49 351 8838 400

Fax +49 351 8838 403

support@biotype.de

www.biotype.de