



Mentype[®] AMLplex^{QS}

PCR Amplification Kit

Instrucciones de uso

**Detección de alteraciones cromosómicas de la
leucemia mieloide aguda**

Diagnósticos en vitro



AMLIFU01v3es

Julio 2021

45-31220-0025

45-31220-0100

45-31220-0400



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
D-01109 DRESDEN
GERMANY

Made in Germany

AMLIFU01v3es

La empresa Biotype GmbH desarrolla, produce y distribuye aplicaciones basadas en PCR para diagnósticos médicos.

Nuestros kits de ensayo Mentype® garantizan los máximos estándares de calidad.

Estamos a su entera disposición para más información y sugerencias. Póngase en contacto con nosotros o visite nuestro sitio web www.biotype.de.

Índice de contenidos

| | |
|---|-----------|
| 1. Uso previsto | 5 |
| 2. Información básica | 5 |
| 3. Descripción del producto Mentype® AMLplex^{QS} | 5 |
| 3.1 Instrumentos | 7 |
| 3.2 Tipo de muestras | 7 |
| 4. Advertencias e indicaciones de seguridad | 8 |
| 4.1 Control de calidad | 8 |
| 5. Material incluido | 9 |
| 5.1 Contenido del kit | 9 |
| 5.2 Información para pedidos | 9 |
| 5.3 Otros reactivos y equipos necesarios (no incluidos en el kit) | 10 |
| 6. Almacenamiento | 11 |
| 7. Etapas de trabajo de Mentype® AMLplex^{QS} | 12 |
| 7.1 Preparación de las muestras y el volumen de aplicación de ADNc | 12 |
| 7.1.1 Aislamiento de ARN | 12 |
| 7.1.2 Transcripción de RNA a ADNc | 12 |
| 7.1.3 Uso del ADNc molde..... | 12 |
| 7.2 Preparación de la mezcla maestra | 13 |
| 7.2.1 Control positivo | 13 |
| 7.2.2 Control negativo..... | 14 |
| 7.3 Volumen de reacción | 15 |
| 8. Programa PCR y amplificación..... | 16 |
| 9. Electroforesis capilar en gel..... | 17 |
| 9.1 Preparación de los productos de PCR | 17 |
| 9.2 Análisis de la fragmentos | 17 |
| 10. Evaluación de datos..... | 19 |
| 10.1 Programa y modelos de evaluación..... | 19 |
| 10.2 Procedimiento de evaluación de datos | 20 |
| 10.2.1 Requisitos generales mínimos para la evaluación de datos..... | 20 |
| 10.2.2 Control del estándar de tamaño Size Standard 550 (BTO)..... | 21 |
| 10.2.3 Comprobación de la escalera alélica /Allelic Ladder | 21 |
| 10.2.4 Comprobación del Control cDNA Kasumi 1 | 24 |
| 10.2.5 Comprobación del control negativo | 24 |
| 10.2.6 Evaluación de los datos de las muestras..... | 25 |
| 11. Troubleshooting..... | 27 |
| 11.1 Límite de detección | 27 |
| 11.2 Superposición (Pull-up Peaks) | 27 |
| 11.3 Adherencia de nucleótidos independiente de la plantilla | 27 |
| 11.4 Artefactos | 28 |
| 11.5 Influencia del tipo de polímero..... | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 12. Información para pedidos | 29 |
| 13. Referencias | 30 |
| 14. Marcas y exención de responsabilidad | 31 |
| 15. Símbolos | 32 |
| Verificación y validación de los kits de amplificación para PCR | |
| Mentype® AMLplex^{QS} PCR..... | 33 |
| A Validación analítica..... | 33 |
| A a) Determinación de la reacción estándar y de las tolerancias específicas de carga | |
| 33 | |
| A b) Verificación de la fidelidad de medición | 33 |
| A c) Verificación de la especificidad analítica | 34 |
| A c) a) Verificación de la especificidad analítica en base a ADNc negativo pretipificado | |
| 34 | |
| A c) b) Verificación de la especificidad analítica en base a ADNc positivo pretipado ... | 34 |
| A d) Verificación de la sensibilidad analítica | 35 |
| A e) Verificación de diferentes termocicladores de PCR | 35 |
| A f) Verificación de la influencia de diferentes temperaturas de alineamiento en la | |
| PCR 35 | |
| A g) Verificación de diferentes cargas tampón de PCR..... | 36 |
| A h) Caducidad después de abierto | 36 |
| B Datos de rendimiento clínico..... | 37 |
| B a) Toma de muestras, aspectos éticos y regulatorios | 37 |
| B b) Ensayo comparativo..... | 37 |
| B c) Extracción de ADN y purificación | 37 |
| B d) Resultados..... | 37 |
| B e) Bibliografía sobre biomarcadores y sus secuencias de ADN | 39 |
| 45 | |

Mentype[®] AMLplex^{QS}

1. Uso previsto

El kit Mentype[®] AMLplex^{QS} está destinado a la detección cualitativa de 34 variantes transcripcionales que pueden generarse en determinados casos de leucemia mieloica aguda (AML) por translocaciones cromosómicas (mutaciones somáticas) bajo la influencia de 11 fusiones génicas diferentes.

Las aplicaciones de Mentype[®] AMLplex^{QS} están destinadas al uso exclusivamente profesional en laboratorios especializados. El personal debe estar capacitado para el uso de técnicas PCR y de diagnósticos en vitro.

2. Información básica

La detección de aberraciones cromosómicas específicas tiene una gran importancia como pronóstico y, por lo tanto, son indispensables en el diagnóstico de leucemias agudas. La identificación de las translocaciones genéticas específicas permite clasificar los subtipos de leucemia para adaptar las terapias al paciente y reducir riesgos.

El kit Mentype[®] AMLplex^{QS} hace posible una sólida identificación, de fácil realización en las rutinas de diagnóstico, de las aberraciones cromosómicas que subyacen a la leucemia mieloica aguda (AML).

3. Descripción del producto Mentype[®] AMLplex^{QS}

Mentype[®] AMLplex^{QS} identifica mediante una fórmula multiparámetro 34 variantes de transcripciones de los siguientes genes de fusión: RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL, PICALM-MLLT10, CBFB-MYH11, DEK-NUP214, KMT2A-MLLT4, KMT2A-MLLT3, KMT2A-ELL, KMT2A-PTD, NPM1-MLF1 y PML-RARA (ver Tabla 1).

Los resultados de Mentype[®] AMLplex^{QS} están asegurados por dos controles internos. El control interno de PCR (Quality Sensor “control QS”) indica el éxito de la reacción de amplificación; un “control ADNc” (control ABL) se encuentra incluido en el kit para mostrar la calidad el ADNc utilizado.

El ensayo consiste en analizar la longitud de los fragmentos mediante electroforesis capilar en gel. El cebador está marcado con los colorantes fluorescentes **6-FAM**, **BTG** o **BTY**.

Tabla 1 Fusiones de genes y variantes de transcripciones que pueden ser detectadas con Mentype® **AMLplex**^{OS}

| Fusión de genes | Aberración cromosómica | 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) | Tipo A Tipo B Tipo C Tipo D Tipo E Tipo F Tipo G Tipo H Tipo I Tipo 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 Instrumentos

Los kits Mentype® **AMLplex^{QS}** han sido verificados y validados para los siguientes termocicladores de PCR:

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

Los kits han sido verificados y validados para los siguientes sistemas de electroforesis capilar en gel utilizando POP-4™ (Applied Biosystems™) y una longitud capilar de 36 cm; se ha verificado el uso de POP-7™:

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

La evaluación de los datos ha sido verificada con las siguientes versiones de software:

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

El uso de los kits Mentype® **AMLplex^{QS}** en otros instrumentos o con software distintos a los indicados más arriba tiene que ser verificado y validado por el usuario bajo su responsabilidad.

3.2 Tipo de muestras

Los kits Mentype® **AMLplex^{QS}** han sido validados con ADNc, sintetizado a partir de ARN que fue aislado de sangre entera con citrato.

El producto Mentype® **AMLplex^{QS}** está validado para el uso de 1 µL de ADNc sintetizado a partir de 1 µg de ARN en un volumen de reacción de 20 µL. El uso de mayores cantidades de ADNc tiene que ser validado por el usuario.

4. Advertencias e indicaciones de seguridad

Por favor, observe las hojas de datos de seguridad (SDS) de los productos Biotype que ponemos con agrado a su disposición previa solicitud (support@biotype.de). Solicite las hojas de datos de seguridad de los reactivos que no estén incluidos en el kit de ensayo al fabricante respectivo.

Lea atentamente las instrucciones de uso antes de utilizar el producto.

Revise todos los componentes en el momento de recibir el producto y controle la cantidad, el tipo y el envasado (ver el capítulo 5.1, Contenido del kit), el correcto marcado, la congelación de los reactivos y el estado del embalaje de los reactivos.

Utilice guantes, bata de laboratorio y, dado el caso, protección ocular para manipular el ensayo.

Evite la contaminación de las muestras con nucleasas (DNasa / RNasa) empleando puntas de pipeta desechables sin DNasa/ RNasa con filtro absorbente de aerosoles.

Utilice zonas de trabajo separadas para la preparación de las muestras (pre-PCR), la preparación de las mezclas maestras y el tratamiento posterior y análisis de las muestras (post-PCR). Conserve los controles positivos separados físicamente de los componentes del kit.

En función de las directivas o de las disposiciones de la normativa local, nacional y/o federal, así como de organizaciones de acreditación, pueden ser necesarios controles adicionales.

No utilice los componentes del kit con la fecha de caducidad sobrepasada y no mezcle las cargas.

Deseche los residuos de las muestras y de los ensayos siguiendo las disposiciones locales de seguridad.

Para lote LEUK01095 (Reaction Mix A lote CH2001597)

Este kit de ensayo contiene la siguiente sustancia potencialmente peligrosa.

Tabla 2 Componentes potencialmente peligrosos de los kits Mentype® AMLplex^{QS}

| Componente | Sustancia química | Riesgo |
|----------------|-------------------------------|--|
| Reaction Mix A | Azida de sodio NaN_3 | Tóxico en caso de ingestión, desarrolla gases tóxicos al contacto con ácidos |

4.1 Control de calidad

Todo el contenido de los kits de ensayo es sometido a estrictos controles de calidad por Biotype GmbH. La calidad de los kits de ensayo es verificada de forma continua para certificar su aplicabilidad. Por favor, envíe todas sus preguntas sobre los controles de calidad a la dirección de correo electrónico support@biotype.de.

5. Material incluido

5.1 Contenido del kit

Los kits Mentype® **AMLplex^{QS}** contienen los componentes siguientes en cantidad suficiente para la realización de 25, 100 o 400 reacciones.

Tabla 3 Tamaños de envase y componentes de los kits Mentype® **AMLplex^{QS}**

| Etiqueta | Contenido | Volumen por tamaño de envase | | |
|---|--|------------------------------|------------|------------|
| | | 25 reac. | 100 reac. | 400 reac. |
| Nuclease-Free Water | Agua libre de nucleasas | 1,5 mL | 2 x 1,5 mL | 6 x 1,5 mL |
| Reaction Mix A | Mezcla de reacción A | 250 µL | 500 µL | 2 x 1,0 mL |
| Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix | Mezcla de cebador | 63 µL | 250 µL | 4 x 250 µL |
| Multi Taq 2 DNA Polymerase | ADN polimerasa Multi Taq 2 | 10 µL | 40 µL | 160 µL |
| Mentype® AMLplex^{QS} Control cDNA Kasumi 1 | ADNc de control Kasumi 1 | 10 µL | 10 µL | 10 µL |
| Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder | Escalera alélica | 25 µL | 25 µL | 4 x 25 µL |
| DNA Size Standard 550 (BTO) | Patrón de longitud de ADN 550 (BTO) | 13 µL | 50 µL | 200 µL |

Tenga en cuenta que los componentes de los diferentes lotes de kits no deben mezclarse. Se puede encontrar una vista general de los números de lote en la etiqueta situada en el interior de la tapa de la caja. No está permitido utilizar alícuotas de los componentes del kit en otros recipientes de reacción.

5.2 Información para pedidos

Por favor, envíe su pedido por escrito a la dirección de correo electrónico sales@biotype.de. El pedido tiene que contener los números de pedido indicados en las tablas Tabla 4 y Tabla , página 29.

Nota: Tenga en cuenta que el tamaño de embalaje 10 para reacciones ya no está a la venta.

Tabla 4 Números de pedido de los kits Mentype® **AMLplex^{QS}**

| Producto | Tamaño | N° de ped. |
|--------------------------------------|----------------|---------------|
| Mentype® AMLplex^{QS} | 25 reacciones | 45-31220-0025 |
| Mentype® AMLplex^{QS} | 100 reacciones | 45-31220-0100 |
| Mentype® AMLplex^{QS} | 400 reacciones | 45-31220-0400 |

5.3 Otros reactivos y equipos necesarios (no incluidos en el kit)

Para la calibración inicial del equipo de electroforesis capilar en gel a los colorantes fluorescentes específicos de los kits Mentype® **AMLplex**^{QS} es necesario realizar una calibración espectral con el siguiente reactivo de Biotype GmbH (Tabla 5).

Tabla 5 Otros reactivos necesarios de Biotype GmbH

| Reactivo | Aplicación | Tamaño | N° de ped. |
|----------------------------|---|-----------|---------------|
| Matrix Standard BT5 single | Calibración espectral del sistema de electroforesis capilar en gel (un capilar) | 5 x 25 µL | 00-10411-0025 |
| Matrix Standard BT5 multi | Calibración espectral del sistema de electroforesis capilar en gel (varios capilares) | 25 µL | 00-10421-0025 |
| Matrix Standard BT5 multi | Calibración espectral del sistema de electroforesis capilar en gel (varios capilares) | 2 x 25 µL | 00-10421-0050 |

Para la amplificación de PCR se necesitan los siguientes materiales e instrumentos:

- centrífuga de mesa con un rotor para recipientes de reacción de 2 mL
- placas de reacción de 96 pocillos o tubos de reacción de 0,2 mL; tapas o films adecuados para las placas de 96 pocillos, una centrífuga con rotor para placas de microtubos
- agitador vórtex, apto para placas de 96 pocillos o tubos de 0,2 mL
- pipetas, puntas de pipeta con filtros (desechables)
- guantes desechables sin polvo
- kit apropiado para el aislamiento de ARN (ver el capítulo 7.1.1, Aislamiento de ARN)
- instrumento adecuado para la medición cuantitativa de la concentración de ARN tras el aislamiento y la purificación (ver el capítulo 7.1.1, Aislamiento de ARN)
- kit apropiado para la sintetización de ARN en ADNc (ver 7.1.2, Transcripción de RNA a ADNc)
- bloque de hielo para la conservación temporal de la polimerasa
- termociclador de PCR apropiado (ver el capítulo 3.1, Instrumentos)
- formamidas Hi-Di™ (Applied Biosystems™)
- reactivos y consumibles para el sistema de electroforesis capilar en gel
- instrumento apropiado para la electroforesis capilar en gel (ver el capítulo 3.1, Instrumentos)

Aviso: verifique si todos los equipos están correctamente instalados, mantenidos y calibrados de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Compruebe si están disponibles todos los reactivos para la realización de la PCR y para el sistema de electroforesis capilar en gel (ver las instrucciones de uso del fabricante respectivo).

6. Almacenamiento

El envío de los kits Mentype® **AMLplex^{QS}** se efectúa en hielo seco. Los componentes del kit llegan congelados. Si alguno de los componentes no está congelado a su llegada o los tubos han sufrido daños durante el transporte, consulte las medidas a tomar con Biotype GmbH (support@biotype.de).

La conservación de los componentes en almacén tiene que efectuarse a una temperatura entre -25 °C y -15 °C. El ADNc de control y los reactivos para la post-PCR (escalera alélica y estándar de tamaño de ADN BTO) deben estar separados de los reactivos para PCR.

Debe evitarse la descongelación y congelación frecuentes. No se permite sobrepasar 20 ciclos de descongelación y congelación.

Los kits Mentype® **AMLplex^{QS}** tienen que estar protegidos de la luz.

La caducidad de los kits de ensayo está indicada en la etiqueta del envase.

7. Etapas de trabajo de Mentype® AMLplex^{QS}

7.1 Preparación de las muestras y el volumen de aplicación de ADNc

7.1.1 Aislamiento de ARN

La calidad del ARN aislado influye de forma decisiva sobre el rendimiento y la capacidad de todo el sistema de ensayo. Es imprescindible garantizar que el sistema empleado para el aislamiento del ARN sea compatible con la tecnología PCR.

Los siguientes kits han sido probados para el aislamiento de ARN y son aptos para la aplicación:

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

El uso de kits de aislamiento de ARN alternativos tiene que ser validado por el usuario bajo su responsabilidad.

Aviso: para la exactitud de los resultados es necesaria una cuantificación de ARN (p. ej. mediante espectroscopia ultravioleta visible UV/VIS con A260 nm y la determinación de calidad con un cociente de A260 / A280, que debería situarse entre 1,7 y 2,0).

7.1.2 Transcripción de RNA a ADNc

Tras realizar con éxito el aislamiento y la cuantificación del ARN tiene lugar la sintetización del ADNc con ayuda de los kits comerciales disponibles en el mercado. Se ha validado una reacción de transcripción con 1 µg de ARN en un volumen de reacción de 20 µL.

Los siguientes kits han sido probados para la sintetización y son aptos para la aplicación:

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

El uso de kits de transcripción alternativos tiene que ser validado por el usuario bajo su responsabilidad.

7.1.3 Uso del ADNc molde

El kit Mentype® AMLplex^{QS} ha sido optimizado para el uso de 1 µL de ADNc (sin diluir), preparado como se describe en el capítulo 7.1.2.

La cantidad de ADNc molde puede aumentarse para muestras de pacientes críticos. Como máximo se debería utilizar 1/10 del volumen de la reacción RT. En la solución de reacción de los kits Mentype® AMLplex^{QS} debe corregirse el volumen de agua sin nucleasas, de

modo que el volumen total de la solución para la PCR sea siempre de 25 µL. Este procedimiento tiene que ser validado por el usuario bajo su propia responsabilidad.

7.2 Preparación de la mezcla maestra

Antes de preparar la mezcla maestra es conveniente mezclar bien (en vórtex) y centrifugar brevemente (aprox. 10 seg.) todos los reactivos. Conserve el ADN polimerasa Multi Taq 2 en un bloque de hielo durante la manipulación.

El volumen total de la solución para la PCR tiene que ser siempre de 25 µL.

Tenga en cuenta los controles positivos y negativos en la cantidad de reacciones de PCR a preparar. Añada a la cantidad total una o dos reacciones para compensar los errores de pipeta.

La tabla siguiente señala los volúmenes de los componentes del kit empleados con un volumen de muestra (ADNc molde) de 1,0 µL en un volumen de reacción de 25 µL.

Tabla 6 Solución de mezcla maestra para una reacción Mentype® **AMLplex^{QS}** con 1 µL de ADNc

| Componente | Volumen por solución PCR |
|--|--------------------------|
| Nuclease-Free Water | 16,1 µL |
| Reaction Mix A* | 5,0 µL |
| Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix | 2,5 µL |
| Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL) | 0,4 µL |
| Volumen total de mezcla maestra | 24,0 µL |
| ADNc molde | 1,0 µL |

* Contiene Mg²⁺, dNTPs, BSA

7.2.1 Control positivo

En primer lugar, diluya el control positivo incluido en el kit Control cDNA Kasumi 1 con agua sin nucleasas en la relación 250 ng/µL (1:2, p. ej. 1 µL Control cDNA Kasumi 1 + 1 µL Nuclease-Free Water).

Utilice para el control positivo el Control cDNA Kasumi 1 diluido en lugar de 1 µL de ADNc molde del control positivo diluido. Pipetee el ADNc de control en lugar del ADNc molde en los tubos de reacción con la mezcla maestra para PCR preparada.

La tabla siguiente muestra los volúmenes de los componentes del kit empleados con 1 µL de ADNc de control y un volumen de reacción de 25 µL.

Tabla 7 Solución de mezcla maestra para una reacción Mentype® **AMLplex**^{QS} con 1 µL de control positivo

| Componente | Volumen por solución PCR |
|--|--------------------------|
| Nuclease-Free Water | 16,1 µL |
| Reaction Mix A* | 5,0 µL |
| Mentype® AMLplex ^{QS} Primer Mix | 2,5 µL |
| Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL) | 0,4 µL |
| Volumen total de mezcla maestra | 24,0 µL |
| Control cDNA Kasumi 1 | 1,0 µL |

* Contiene Mg²⁺, dNTPs, BSA

7.2.2 Control negativo

Como control negativo (No Template Control), pipetee en los tubos de reacción 1 µL de agua sin nucleasas, en lugar del ADNc molde, con la mezcla maestra para PCR preparada.

La siguiente tabla muestra los volúmenes de los componentes del kit utilizados con 1 µL de agua sin nucleasas y un volumen de reacción de 25 µL.

Tabla 8 Solución de mezcla maestra de control negativo para una reacción Mentype® **AMLplex**^{QS}

| Componente | Volumen por solución PCR |
|--|--------------------------|
| Nuclease-Free Water | 16,1 µL |
| Reaction Mix A* | 5,0 µL |
| Mentype® AMLplex ^{QS} Primer Mix | 2,5 µL |
| Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL) | 0,4 µL |
| Volumen total de mezcla maestra | 24,0 µL |
| Agua sin nucleasas control negativo | 1,0 µL |

* Contiene Mg²⁺, dNTPs, BSA

Como muestra de control negativo se puede agregar adicionalmente un ADNc negativo ya conocido para las fusiones genéticas y translocaciones de detección. Esa debe ser procesada como una muestra normal y aplicada en la PCR como reacción extra.

7.3 Volumen de reacción

Pipetee 24 μL de la mezcla maestra de PCR en los recipientes de reacción o en la placa multipocillos. Añada luego 1 μL del ADNc o 1 μL del control positivo o negativo.

Tras el pipeteado hay que cerrar los tubos de reacción o las placas multipocillos. Mezcle y centrifuge brevemente los preparados para la reacción y colóquelos a continuación en el termociclador de PCR para la amplificación.

8. Programa PCR y amplificación

Se debería ejecutar un ciclo "**hot start**" con el fin de activar la ADN polimerasa Multi Taq 2 y evitar la formación de productos inespecíficos de la amplificación.

Para determinar la cantidad óptima de los ciclos de PCR necesarios se puede emplear el control ABL interno como referencia. El pico en el resultado no debería sobrepasar el rango de medición específico del sistema (p. ej. de 500 a 5000 RFU en el sistema ABI 3130).

Si la concentración de ADNc es demasiado baja pueden producirse errores estadísticos (Allelic Dropouts) y picos desequilibrados. Pero al incrementar la cantidad de ciclos, aumenta también la probabilidad de que se generen productos de amplificación inespecíficos.

Aviso: para un equilibrio óptimo del kit se debería ajustar las velocidades de calentamiento y enfriamiento a 4 °C/s.

Tabla 9 Parámetros de amplificación de la PCR para la realización de Mentype® **AMLplex^{QS}**

| Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|--------------|--------------|---|
| 96 °C | 4 min | 1 ciclo (hot start para activar la ADN polimerasa Multi Taq2) |
| 96 °C | 30 s | |
| 61 °C | 120 s | 22-28 ciclos |
| 72 °C | 75 s | |
| 68 °C | 10 min* | 1 ciclo |
| 10 °C | ∞ | hold |

* Si se produjese un mayor porcentaje de -Adenin Peaks (-1 bp), se puede prolongar este paso a un máximo de 60 minutos.

La cantidad de ciclos depende de la cantidad de ADNc empleada y del nivel de expresión de la variante de transcripción a detectar. Se han realizado ensayos con cantidades entre 22 y 28 ciclos. Para las muestras de referencia, material de cultivo celular (tasa de expresión elevada), recomendamos reducir los ciclos de PCR a 22. Para alcanzar la sensibilidad máxima (11.1 Límite de detección) se recomienda emplear el número máximo de 28 ciclos.

9. Electroforesis capilar en gel

9.1 Preparación de los productos de PCR

Al final de la PCR, retire las muestras del termociclador y centrifúguelas brevemente. Descongele los reactivos formamida Hi-Di™ (no incluida en el kit) y DNA Size Standard 550 (BTO), mezcle los tubos de ensayo brevemente y centrifúguelos brevemente. Prepare la composición descrita en la tabla 10 de formamida Hi-Di™ y el patrón de tamaño BTO (550), y añada a la mezcla exceso para una o dos reacciones para compensar las variaciones producidas por el pipeteo.

Tabla 10. Composición de la mezcla de desnaturalización

| Componentes | Volumen por reacción |
|-----------------------------|----------------------|
| Formamida Hi-Di™ | 12,0 µL |
| DNA Size Standard 550 (BTO) | 0,5 µL |

Pipetee 12 µL de la mezcla de desnaturalización de formamida y DNA Size Standard 550 (BTO) en la cantidad correspondiente de pocillos de una placa de PCR (adecuada para su uso en un analizador genético). Después, añada o bien 1 µL de producto de PCR, o bien 1 µL de escalera alélica (Allelic Ladder) de Mentype® **AMLplex^{QS}** por pocillo. Tape la placa de PCR con un cubre adhesivo adecuado, mézclela en el vórtex y centrifugue la placa brevemente. Retire el cubre adhesivo y tape la placa con la tapa del fabricante del aparato.

Nota: La escalera alélica se utiliza para determinar correctamente los fragmentos analizados durante el análisis de datos. En cada análisis de fragmentos, la escalera alélica debe ser analizada al menos una vez para garantizar el análisis satisfactorio de los datos.

Nota: Los capilares del aparato de electroforesis en gel no deben estar secos. Si las muestras no ocupan todas las posiciones de los capilares, rellene los pocillos restantes de la placa con 12 µL de formamida Hi-Di™ según el número de capilares.

Desnaturalice los productos de PCR preparados en un termociclador de PCR durante 3 minutos a 95 °C, enfríe las muestras en un ciclador a 4 °C. Centrifugue brevemente las muestras antes de ejecutar el análisis de fragmentos.

9.2 Análisis de la fragmentos

Se pueden encontrar instrucciones generales sobre el analizador, la producción de la matriz y la aplicación del software GeneMapper™ en el manual correspondiente *ABI PRISM® Genetic Analyzer User's Manual*.

Después de haber efectuado la calibración espectral del dispositivo de electroforesis capilar en gel con el reactivo Matrix Standard BT5 (Biotype GmbH), cree un módulo de

funcionamiento específico (ABI 310, ABI 3130) o un protocolo de instrumentos (ABI 3500) con los siguientes parámetros:

Tabla 11. Parámetros de funcionamiento específicos para el análisis de los fragmentos de 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 |

No obstante lo dispuesto en los valores de la tabla 11, el tiempo de ejecución puede ajustarse para analizar todos los fragmentos (60-550 bp) del patrón de tamaño 550.

Nota: Siga las instrucciones del fabricante del equipo de electroforesis capilar en gel para ajustar los parámetros de funcionamiento específicos.

Nota: Tenga en cuenta asimismo la información adicional sobre calibración y aplicación de los productos Mentype® en aparatos de electroforesis capilar en gel. Esta puede solicitarse a Biotype GmbH a través de support@biotype.de.

10. Evaluación de datos

10.1 Programa y modelos de evaluación

La evaluación de datos se efectúa con el programa GeneMapper™ ID o GeneMapper™ ID-X (Applied Biosystems™).

Para facilitar la evaluación de los datos, Biotype GmbH pone a disposición parámetros ya ajustados en www.biotype.de (Tabla 12). Estos pueden ser importados en la versión correspondiente del GeneMapper™, permitiendo prescindir de la configuración manual de los parámetros de análisis.

Aviso: La importación y la asignación de los alelos con ayuda de las plantillas de evaluación disponibles solo está garantizada para el programa GeneMapper™ ID/ID-X. Si utiliza GeneMapper™ pueden producirse problemas al importar algunas plantillas de evaluación.

Aviso: las plantillas disponibles para los parámetros de Bins y Panel definen la longitud de los distintos fragmentos. Por las ligeras diferencias de capacidad de los distintos equipos de electroforesis capilar en gel pueden producirse mínimas variaciones entre los equipos. Biotype GmbH puede efectuar un ajuste específico de Bins y de Panel. Por favor, póngase en contacto con nosotros support@biotype.de.

Tabla 12 Plantillas disponibles para la importación en GeneMapper™ ID/ID-X

| Plantilla | Nombre | |
|-----------------|-------------------------|--------------------|
| Panels | AMLplex_Panels_v2/v2x | O versión superior |
| BinSets | AMLplex_Bins_v2/v2x | O versión superior |
| Size Standard | SST-BTO_60-550bp | |
| Analysis Method | AMLplex_HID_310_200RFU | Recomendado |
| | AMLplex_HID_3130_200RFU | Recomendado |
| Plot Settings | PlotsBT5_4dyes | |
| Table Setting | Table for 10 Alleles | |
| | Table for 22 Alleles | |

A continuación se exponen los parámetros necesarios para la configuración manual del método de análisis (Tabla 13).

Tabla 13 Parámetros para la configuración manual de un método de análisis en GeneMapper™ ID/ID-X

| Parámetro | Ajuste |
|---------------------------|---|
| 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 |

* Si es necesario se puede reducir el Peak Window Size a 11 pts.

10.2 Procedimiento de evaluación de datos

10.2.1 Requisitos generales mínimos para la evaluación de datos

Los archivos fsa de la electroforesis capilar en gel son evaluados cualitativamente, es decir que se verifica la presencia de picos de amplificación. Un pico tiene que alcanzar un mínimo de 200 RFU y tener un tamaño al menos 3 veces el ruido de fondo de la línea base. Estos criterios se aplican a los picos de control (controles QS y ABL), así como a los picos de las fusiones genéticas.

La única excepción es el estándar de tamaño DNA Size Standard 550 (BTO), que solo tiene que alcanzar una altura pico mínima de 50 RFU.

10.2.2 Control del estándar de tamaño Size Standard 550 (BTO)

La determinación de las longitudes exactas de los fragmentos de los productos amplificados depende del estándar de longitud de ADN utilizado. Debido a la complejidad de algunos Loci se debería tomar el mayor número posible de puntos de referencia distribuidos homogéneamente para determinar las longitudes. Utilice para ello el estándar de longitud de DNA Size Standard 550 (BTO, Figura 1) con las longitudes de 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 y 550 bp.

Compruebe en el electroferograma (canal naranja) de todas las muestras si están presentes todos los alelos del estándar de tamaño, si poseen una altura pico suficiente de al menos 50 RFU y si están correctamente asignados (ver Figura 1).

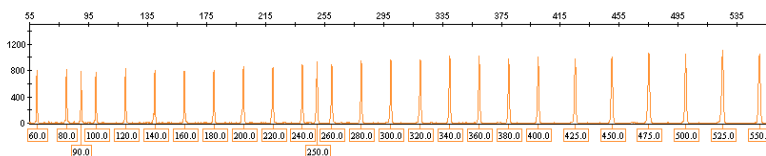


Figura 1 Electroferograma del DNA Size Standard 550 (BTO), analizado en ABI 3500, con el programa GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, eje y: 55-560 bp, eje x: 0-1 500 RFU

Aviso: si no se han analizado todos los fragmentos del estándar de tamaño en las diferentes muestras, la valoración de la escalera alélica y de las muestras puede ser insuficiente. Verifique siempre si se ha ejecutado correctamente el análisis del estándar de tamaño.

10.2.3 Comprobación de la escalera alélica /Allelic Ladder

La escalera alélica contiene todos los fragmentos detectables con el Mentype® **AMLplex^{QS}** (ver Tabla 1 y Figura 2). Por consiguiente, esos fragmentos tienen que estar presentes en la escalera alélica y ser detectados con al menos una altura de 200 RFU. Los genes de fusión y las variantes de transcripción asociadas se encuentran siempre en un canal de color (Tabla 14).

Tabla 14 Distribución de las fusiones genéticas en los canales de color

| Canal azul | Canal verde | Canal amarillo |
|---------------------------|-----------------------|----------------|
| 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) | |
| Controles QS y ABL | | |

Aviso: si utilizando los modelos de evaluación (sobre todo de Bins y Panels) no se señalan automáticamente todos los fragmentos de la escalera alélica diríjase a support@biotype.de, pues puede ser necesaria una adaptación de las plantillas a su configuración. En ese caso podría producirse una calificación errónea de los picos en las muestras.

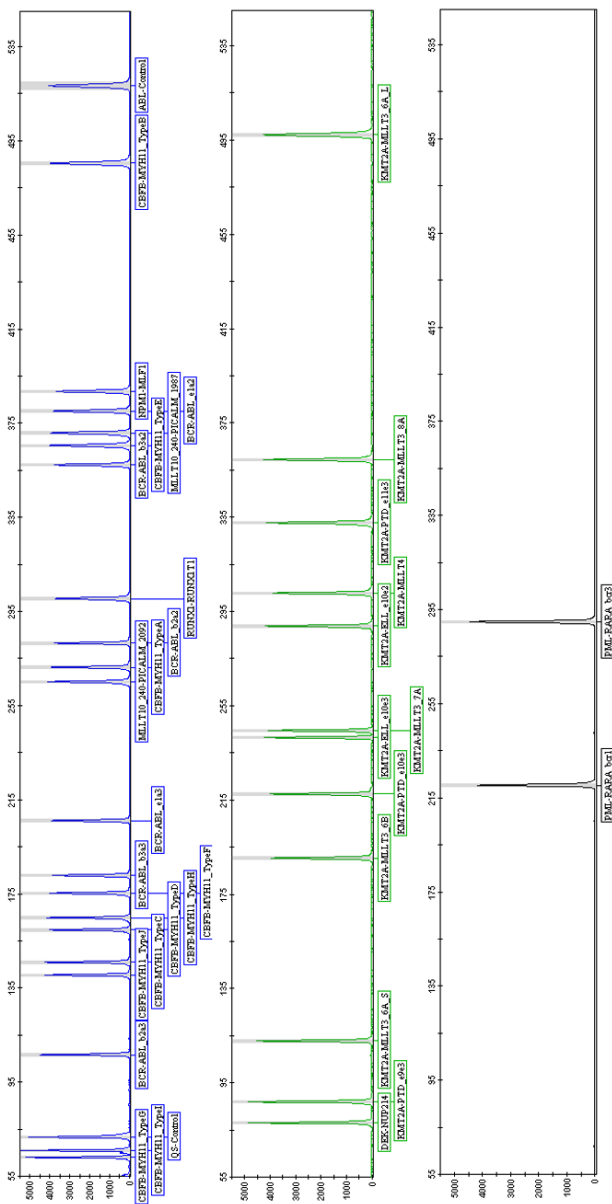


Figura 2 Electroforegrama de la escalera alélica, analizada en ABI 3500, evaluación con el programa GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, eje y: 55-550 bp, eje x: 0-5 500 RFU

10.2.4 Comprobación del Control cDNA Kasumi 1

El kit Mentype® **AMLplex^{QS}** incluye el control positivo Control cDNA Kasumi 1*, que es positivo para la fusión genética RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO).

Compruebe si los picos de control de QS y ABL tienen una altura suficiente. Compruebe si el pico para la translocación RUNX1-RUNX1T1 tiene una altura suficiente en el electroforegrama (Figura 3). Compruebe que no se presente ningún producto secundario inesperado en el electroforegrama.

* El cultivo celular para la obtención de ADnc ha sido adquirido de: DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany. El uso de ese ADnc está previsto exclusivamente para el Mentype® **AMLplex^{QS}**.

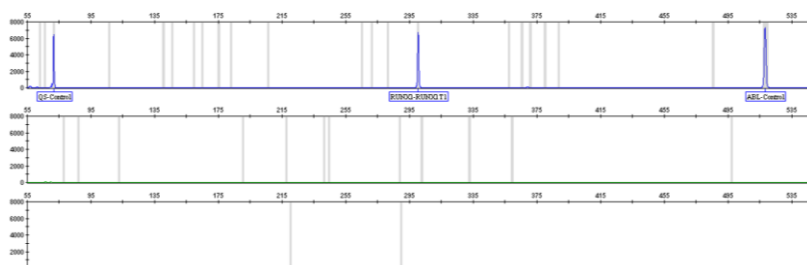


Figura 3 Electroforegrama del Control cDNA Kasumi 1, analizado en ABI 3500, GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, eje y 55-550 bp, eje x 0-8 000 RFU

10.2.5 Comprobación del control negativo

Compruebe que el electroforegrama no contenga ningún pico específico superior a 200 RFU para una translocación (canal azul, verde, amarillo).

Control No-Template: compruebe que solo el pico de control de QS tenga suficiente altura, pero no el pico de ABL-Control (Figura 4).

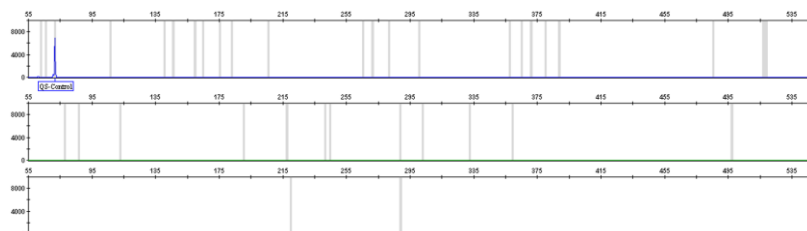


Figura 4 Electroforegrama de un Non Template Control, analizado en ABI 3500, GeneMapper ID-X 1.4, Template Files v3x, eje y 0-10 000 RFU, eje x 55-550 bp

Muestra de control negativo: compruebe que, con un ADNc conocido, negativo para las fusiones génicas y translocaciones a detectar, los picos de control de QS y ABL tengan suficiente altura (Figura 5).

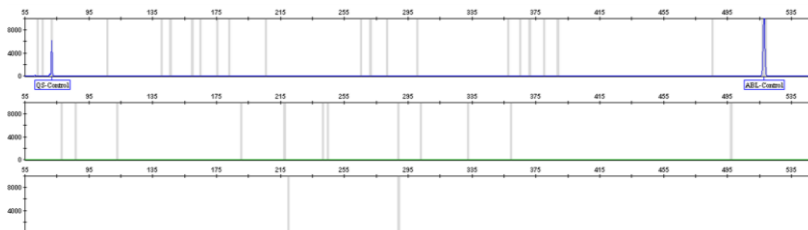


Figura 5 Electroforegrama de una muestra de control negativa, analizada en ABI 3500, GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, eje y 0-10 000 RFU, eje x 55-550 bp

10.2.6 Evaluación de los datos de las muestras

Una vez comprobados los estándares de tamaño, la escalera alélica y las muestras de control tiene lugar la evaluación de los datos de las muestras.

Aviso: Mentype® **AMLplex^{QS}** es un ensayo puramente cualitativo. Se hace constar explícitamente que no es posible una evaluación cuantitativa, p. ej. en el marco de una determinación de MRD.

Utilizando los modelos de evaluación de Biotype GmbH y tras la evaluación correcta de la escalera alélica del análisis se señalan automáticamente los fragmentos de PCR detectados. Encontrará una sinopsis de las longitudes de los fragmentos de los productos PCR en Tabla 15.

Aviso: Mentype® **AMLplex^{QS}** ha sido validado y certificado con POP-4™. El uso de otro polímero (p. ej. POP-7™ o POP-6™) puede modificar el comportamiento de los productos de PCR específicos en el análisis. En determinadas circunstancias puede ser necesario adaptar las plantillas Biotype (Panels y BinSet). Por favor, dirijase a nuestro servicio técnico (support@biotype.de). Se ha observado, además, que un cambio en el comportamiento de los restos de colorantes fluorescentes libres provoca mayor ruido de fondo.

Tabla 15 Longitudes de fragmentos de cada translocación en la escalera alélica del Mentype® **AMLplex**^{QS}, determinadas empleando POP-4™; † para la variante KMT2A-MLLT3_6A se esperan dos amplicones; * debido a la longitud variable del amplicón del PML-RARA_bcr2 (aprox. 173 bp) no es posible la calificación automática de la variante, pero si puede ser detectada con el cebador del Mentype® **AMLplex**^{QS}

| Panel / translocación | Tamaño [bp] | Panel / translocación | Tamaño [bp] |
|------------------------|-------------|-----------------------|-------------|
| Canal azul | | Canal verde | |
| 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 | Canal amarillo | |
| 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

Gracias a la evaluación post-PCR descrita más arriba, la calificación automática de los alelos garantiza una diferenciación exacta y fiable de las transcripciones genéticas de fusión y sus variantes. Por favor, compruebe la correcta calificación de los alelos en la escalera alélica de cada proceso.

11.1 Límite de detección

En los ensayos con plásmidos se ha determinado un límite de detección $\leq 1\ 000$ copias para 32 de 34 variantes de transcripción con 25 ciclos. Las variantes de transcripción CFBF-MYH11_tipo C y KMT2A-MLLT4 (MLL-AF6) difieren de ello. Con 28 ciclos se pueden determinar 1 000 copias de CFBF-MYH11_tipo C y 10 000 copias de KMT2A-MLLT4 (MLL-AF6). Si se dispone de las copias indicadas, se pueden alcanzar picos > 200 RFU .

Esta aplicación es una herramienta de diagnóstico basada en PCR que ha sido desarrollada, validada y certificada para la clasificación de subtipos de AML. No es apta para la cuantificación o la monitorización de una enfermedad residual mínima (MRD por sus siglas en inglés).

11.2 Superposición (Pull-up Peaks)

Se pueden producir superposiciones entre los paneles de color cuando se ha empleado una matriz inadecuada para el análisis o las alturas de los picos del producto de PCR se sitúan fuera del rango de detección lineal del equipo. Estas se presentan en la misma posición que los picos específicos en otros paneles de color (por regla general con bajas intensidades de señal).

Aviso: si es necesario, diluya los productos PCR antes de la electroforesis capilar en gel para obtener resultados evaluables de forma inequívoca. Si se producen superposiciones a pesar de que las alturas de fluorescencia son óptimas se debería renovar la matriz.

11.3 Adherencia de nucleótidos independiente de la plantilla

Debido a su actividad transferasa terminal, la ADN polimerasa Multi Taq añade preferentemente una adenosina al extremo 3' del fragmento de ADN amplificado. Cuando el sistema de PCR no dispone de tiempo suficiente para la extensión o cuando las secuencias de cebadores no favorecen la extensión, no se produce esta adherencia. Este artefacto puede ser identificado por la aparición de un fragmento de base más corta (-1 bp peak). Todos los cebadores Biotype están diseñados para minimizar esta formación de artefactos. También se reduce la formación del artefacto con el último paso de la extensión en el protocolo de PCR (68 °C durante 10 min.). La altura de pico del artefacto aumenta con cantidades de ADNc elevadas. Para evaluar los picos, cada laboratorio debería definir valores límite propios para ello.

11.4 Artefactos

La temperatura ambiente puede influir en gran medida en el comportamiento de los productos PCR en los sistemas capilares y provocar escalones o dobletes (split peaks) si la temperatura es demasiado baja. También puede afectar a la calificación automática de los alelos. Cuando se observen estos efectos, se recomienda inyectar de nuevo las muestras, eventualmente también con varias escaleras alélicas por análisis. Tenga en cuenta, por favor, que es necesario respetar la temperatura de trabajo recomendada por el fabricante del aparato. Las condiciones óptimas son > 22 °C de temperatura ambiente.

11.5 Influencia del tipo de polímero

Mentype® **AMLplex^{QS}** ha sido validado y certificado con POP-4™. El uso de otro polímero (p. ej. POP-7™ o POP-6™) puede modificar el comportamiento de los productos PCR específicos en el proceso. En determinadas circunstancias puede ser necesario adaptar las plantillas Biotype (Panels y BinSet). Por favor, diríjase a nuestro servicio técnico (support@biotype.de). Se ha observado, además, que un cambio en el comportamiento de los restos de colorantes fluorescentes libres provoca mayor ruido de fondo.

12. Información para pedidos

Tabla 16 Información detallada para los pedidos de los kits Mentype® **AMLplex**^{QS}

| Kit | Tamaño | Número de pedido |
|---------------------------------------|----------------|-------------------------|
| Mentype® AMLplex ^{QS} | 25 reacciones | 45-31220-0025 |
| Mentype® AMLplex ^{QS} | 100 reacciones | 45-31220-0100 |
| Mentype® AMLplex ^{QS} | 400 reacciones | 45-31220-0400 |

13. Referencias

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. Marcas y exención de responsabilidad

Los nombres, marcas, etc. registrados utilizados en este documento no deben ser considerados como no protegidos aunque no estén marcados explícitamente como tales: 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.).

Los kits Mentype[®] **AMLplex^{QS}** son kits con el marcado CE de conformidad con la Directiva europea 98/79/CE para los diagnósticos in vitro. Los kits no están disponibles como diagnósticos in vitro fuera de ese rango regulatorio.

15. Símbolos



Fabricante



Designación de carga



Suficiente para <N> ensayos



Referencia a eIFU



Fecha de caducidad



Rango de temperatura



Número de pedido



Diagnósticos en vitro



Proteger de la luz



Mantener seco

Verificación y validación de los kits de amplificación para PCR Mentype® AMLplex^{QS} PCR

A Validación analítica

A a) Determinación de la reacción estándar y de las tolerancias específicas de carga

Objetivos: determinar la reacción estándar y las tolerancias específicas de carga en relación a las alturas de señal absolutas (RFU), el equilibrio de las alturas de señal de la PCR múltiple y de la línea base. Así como, en función de los resultados, fijar los ajustes del sistema específicos del ensayo para la genotipificación por electroforesis capilar en gel (Bins y Panels), empleando los modelos de evaluación de los sistemas de secuenciación automática de ADN.

Método: el kit de ensayo incluye el ADNc de control de la línea celular KASUMI-1 (ACC220, Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) que contiene la fusión genética AML1-ETO con la aberración cromosómica t(8; 21) (q22; q22) [7]. Se ha empleado, además, una mezcla molde equimolar de plásmidos artificial que contiene 33 de las 34 variantes a detectar. La reacción estándar fue ejecutada con el ADNc de control en la concentración de referencia de 250 ng por solución de PCR y 25 ciclos de PCR. La mezcla molde fue ajustada de tal modo que, tras 25 ciclos de PCR, se alcanzaron alturas de señal en el rango de medición lineal de los sistemas de análisis empleados (máx. 5 000 RFU). Se ha llevado a cabo una determinación cuádruple con cuatro valores ciegos (no template control, NTC) sin ADN.

Resultados: para la mezcla de cargas específica del cebador para PCR se han determinado las especificaciones siguientes: utilizando un analizador ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer se han alcanzado alturas de señal de 1 000-4 000 RFU y empleando un ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer alturas de 1 000-5 000 RFU con el uso de la mezcla molde. Se han detectado señales específicas a partir de una altura de señal de 200 RFU. En el intervalo de escalonamiento no se han detectado señales inespecíficas en los valores ciegos (sin colorantes, artefactos) > 200 RFU (línea base).

A b) Verificación de la fidelidad de medición

Objetivos: obtener información acerca de la fidelidad del método de medición y un resumen suficientemente detallado de los datos que permita valorar si el medio es adecuado para la determinar la fidelidad. Las mediciones de fidelidad son aplicables tanto para los ensayos cuantitativos como cualitativos únicamente si se dispone de una norma o método de referencia.

Método: el kit ha sido validado a través de la participación periódica en ensayos cooperativos, verificándose la fidelidad cualitativa de los resultados (diagnóstico). Biotype participa regularmente desde el 03/06/2013 en los ensayos cooperativos de United Kingdom National Quality Assessment Schemes (UKNEQAS, www.ukneqas.org.uk) para la detección de las translocaciones BCR-ABL y AML.

Esos ensayos tienen lugar periódicamente (2 veces) al año y son evaluados por organismos oficiales. Los resultados (Performance Status), también en comparación con los otros participantes, son enviados tras la participación.

Resultados: el "performance status" de Biotype es hasta ahora "green". Ha quedado demostrado que el producto es apto para la detección de variantes BCR-ABL y translocaciones de AML y, en comparación con otros métodos genéticos moleculares, arroja resultados correctos (cualitativos).

A c) Verificación de la especificidad analítica

A c) a) Verificación de la especificidad analítica en base a ADNc negativo pretipificado

Objetivos: las pruebas han servido para evitar resultados positivos erróneos consecuencia de una reactividad de interferencia y cruzada con los ADNc seleccionados de muestras negativas pretipadas (pacientes y donantes sanos).

Método: análisis de 22 ADNc pretipados como negativos para las variantes de translocación a detectar con el kit de ensayo. Las cantidades utilizadas debían cubrir el rango de las concentraciones esperables en la práctica clínica y ascendieron desde 145 ng hasta un máximo de 934 ng ADNc por solución de PCR con 25 ciclos.

Resultados: en el intervalo de alelos fijado por los Bins y Panels (plantillas) no se ha generado ninguna reactividad cruzada (> 200 RFU). La señal de medición para el control interno de ADNc (gen ABL) superó > 200 RFU en 21 ADNc, y en solo un caso aprox. 50 RFU. El valor límite para la calificación automática de alelos ha sido fijado en 200 RFU.

A c) b) Verificación de la especificidad analítica en base a ADNc positivo pretipado

Objetivos: las pruebas han servido para excluir resultados positivos erróneos consecuencia de una reactividad por interferencia y cruzada del cebador con los ADNc seleccionados de pacientes positivos pretipados.

Método: análisis de 20 ADNc pretipados como positivos para las variantes de translocación a detectar con el kit de ensayo. La cantidad utilizada fue fijada en 250 ng cDNA por solución de PCR. El programa de PCR ha sido ejecutado con 25 ciclos.

Resultados: se ha podido detectar claramente todas las mutaciones somáticas predeterminadas. No se ha establecido ninguna reactividad cruzada (> 50 RFU) en el intervalo de los alelos. Las señales de medición para las mutaciones somáticas y el control con ADNc interno (gen ABL) superaron > 200 RFU en 16 muestras sobre 20 muestras y > 50 RFU en 3 muestras sobre 20. Una muestra alcanzó únicamente valores inferiores a 50 RFU, si bien aún era detectable la variante del gen de fusión. El valor límite para la calificación automática de alelos ha sido fijado en 200 RFU.

A d) Verificación de la sensibilidad analítica

Objetivos: estas pruebas han servido para determinar el límite analítico demostrable de los ensayos (sensibilidad).

Método: análisis de una serie diluida con 1 µg hasta 31,25 ng de ADNc de referencia (Kasumi-1) en una determinación cuádruple. El programa de PCR ha sido ejecutado con 25 ciclos. Además, para cada variante de transcripción a detectar, se han analizado series diluidas de un molde de referencia de fabricación artificial (plásmidos, GeneArt, Life Technologies) con un número de copias definido en una determinación doble.

Resultados: hasta una concentración de ADNc de 62,5 ng se ha podido detectar intensidades de señal > 200 RFU, tanto para la translocación específica como también para el control de ABL. Con 31,25 ng las intensidades de señal de la variante específica alcanzaron > 200 RFU y del control ABL > 50 RFU. Valores óptimos en relación al intervalo de medición del secuenciador capilar se alcanzaron en el rango de 150 ng – 250 ng. Las mediciones de los diluidos de plásmidos arrojaron que se puede alcanzar un límite de detección > 200 RFU de 100-1 000 copias para todas las variante de translocación.

A e) Verificación de diferentes termocicladores de PCR

Objetivos: los termocicladores de diferentes marcas se diferencian en sus especificaciones. Pueden ser diferentes velocidades de calentamiento y enfriamiento o diferentes técnicas de regulación de la temperatura.

Método: realización de ensayos de reacciones estándar con ADN de control en la concentración de 250 ng con los termocicladores siguientes en determinaciones cuádruples con la misma mezcla maestra y 2 muestras ciegas sin ADN: termociclador Eppendorf Mastercycler ep-S (Eppendorf AG, Hamburg), Applied Biosystems® GeneAmp 9700 con bloque de plata (Life Technology GmbH, Darmstadt), Applied Biosystems® GeneAmp 9700 con bloque de aluminio (Life Technology GmbH, Darmstadt).

Resultados: en todos los tipos de amplificadores se ha podido constatar una correcta calificación de todos los productos amplificados. Todos los fragmentos de la mezcla molde han sido amplificados correctamente.

A f) Verificación de la influencia de diferentes temperaturas de alineamiento en la PCR

Objetivos: para determinar la robustez de las PCR se han simulado oscilaciones de temperatura en la etapa de adición de cebador (alineamiento) de la PCR múltiple. Esa fase de temperatura es crítica para la sensibilidad y especificidad de las PCR.

Método: variación de ± 1 °C y ± 2 °C en la temperatura de alineamiento específica del kit de 60 °C para la reacción estándar con ADN de control en la concentración nominal de 250 ng. Le siguió una determinación triple con la misma mezcla maestra.

Resultados: el kit es estable en torno a la temperatura de alineamiento especificada con oscilaciones técnicas del sistema de ± 1 °C. Se han alcanzado alturas de señal óptimas en todos los sistemas con la temperatura de alineamiento de 61 °C.

A g) Verificación de diferentes cargas tampón de PCR

Objetivos: las relaciones de concentración de los ingredientes en la mezcla de reacción tampón A para la PCR (dNTPs, concentración iónica, en particular Mg^{2+}) son decisivas para la sensibilidad, la especificidad y el equilibrio de las señales en la PCR múltiple. Por eso se ha verificado la robustez del ensayo frente a las oscilaciones de las cargas del tampón para PCR suministrado.

Método: prueba de 3 cargas REM-A independientes en la reacción estándar con ADN de control, en la concentración nominal de 250 ng, así como de la escalera alélica y de una línea de ADNc con expresión débil (MLL-AF6).

Resultados: cada carga REM A creada nueva es analizada con el kit de amplificación Mentype® **AMLplex^{QS}**. La autorización de la carga REM A solo se produce cuando los resultados obtenidos con el Mentype® **AMLplex^{QS}** se encuentran dentro de la especificación.

A h) Caducidad después de abierto

Objetivos: probar la estabilidad de los reactivos del kit PCR tras la repetición de fases de congelación y descongelación.

Método: someter a los reactivos del kit a 20 ciclos de congelación y descongelación. La congelación se ha realizado durante al menos 1 h a -20 °C. La descongelación se ha efectuado a temperatura ambiente y los reactivos han sido homogeneizados antes del uso mediante agitación. Finalmente se ha ejecutado una reacción estándar con ADN de control en la concentración nominal de 250 ng y valores ciegos adicionales sin ADN en determinaciones triples. La evaluación se realizó mediante la comparación con una reacción estándar sin ciclos de congelación y descongelación.

Resultados: la desviación de las alturas promedio de los picos en comparación con la reacción estándar fue de un máximo del 20 % (sobre todo pérdida de señal). En los valores ciegos no se constataron picos adicionales > 50 RFU dentro del intervalo de escalonamiento.

B Datos de rendimiento clínico

B a) Toma de muestras, aspectos éticos y regulatorios

Se ha llevado a cabo un control para evaluar el rendimiento según los artículos 20 a 24 de la Ley alemana de productos médicos (DE). El Instituto Federal de Fármacos y Productos Médicos ha otorgado la exención de aprobación obligatoria para productos médicos con bajo riesgo para la seguridad según el artículo 7 del reglamento relativo a controles clínicos de productos médicos. Había constancia de voto aprobatorio de la comisión ética competente y de declaraciones de consentimiento de los pacientes.

Se ha empleado sangre entera venosa de 297 pacientes y de 10 personas de experimentación sanas.

B b) Ensayo comparativo

El objetivo primario es determinar las sensibilidades y especificidades del diagnóstico en comparación con los métodos de referencia. Para una selección de las translocaciones se disponía de métodos citogenéticos estandarizados (cariotipo, análisis FISH) [8]. Para las translocaciones que no podían ser representadas por métodos citogenéticos se han empleado ensayos PCR monoplex-nested validados y establecidos [9, 10].

B c) Extracción de ADN y purificación

Mediante centrifugación con gradiente de densidad se han obtenido células mononucleares (MNC) a partir de sangre entera heparinizada. A continuación se ha obtenido el ARNm completo empleando los kits de extracción de ARNm comerciales (RNeasy Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, DE). A partir de ese se ha sintetizado el ADNc también con kits comerciales (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen GmbH, Hilden, DE). La calidad del ADNc ha sido verificada por medio de una Realtime-PCR (In-House-Test validado). Cada gen de fusión individual o mutación ha sido comprobado con PCR individuales validadas.

B d) Resultados

El kit de amplificación de PCR Mentype® **AMLplex^{QS}** no ha localizado ninguna mutación en el ADNc de las 10 personas de experimentación. Esos resultados no han sido considerados en los otros cálculos de resultados. A continuación se han analizado 297 muestras de pacientes. 5 de ellas no pudieron ser evaluadas (señal de control para ABL inferior al valor umbral recomendado). De las 292 muestras restantes, 199 fueron identificadas correctamente como negativas en comparación con el cariotipado, FISH y/o la PCR de control. 56 de las muestras negativas correctas mostraron en el cariotipo modificaciones genéticas (anomalías cromosómicas) que no han podido ser detectadas con el kit de ensayo. Esto se explica porque, si bien es cierto que el kit de amplificación de PCR Mentype® **AMLplex^{QS}** contiene las translocaciones más frecuentes, solo cubre un 37 % de las anomalías genéticas más observadas en la AML [8]. Los

resultados de las diferentes pruebas de verificación están recogidos en la tabla 17.

En conjunto se ha obtenido una sensibilidad de diagnóstico del 94 % y una especificidad de diagnóstico del 99,5 %. Con la PCR de control [9, 10] se ha podido confirmar inequívocamente los diagnósticos citogenéticos verificados.

Tabla 17: Resultados de las pruebas de evaluación de rendimiento

| Fusión genética | Biomarcador | | Prevalencia [%] * | Correcta positiva | Evaluación de rendimiento de pruebas clínicas (n=292) | | | Sensibilidad de diagnóstico [%] | Especificidad de diagnóstico [%] |
|-----------------|----------------------------|--|-------------------|-------------------|---|------------------|------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | Aberración cromosómica | Variante | | | Correcta negativa | Errónea positiva | Errónea negativa | | |
| 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_2 40- PICALM_1 987 MLLT10_2 40- PICALM_2 092 | 1 | 0 | 262 | 0 | 0 | NA | 100.0 |
| CBFB-MYH11 | inv(16) (p13;q22) | Tipo A Tipo B Tipo C Tipo D Tipo E Tipo F Tipo G Tipo H Tipo I Tipo 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) Bibliografía sobre biomarcadores y sus secuencias de ADN

Ponencias y citas de los bancos de datos de ADN

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.*

Bibliografía seleccionada sobre 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.

Bibliografía seleccionada sobre 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.

Bibliografía seleccionada sobre 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.

Bibliografía seleccionada sobre 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

Bibliografía seleccionada sobre CBFβ-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 CBFβ-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 (CBFβ-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

Bibliografía seleccionada sobre 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.

Bibliografía seleccionada sobre 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, 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.

Bibliografía seleccionada sobre 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.

Bibliografía seleccionada sobre 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.

Bibliografía seleccionada sobre 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.

Bibliografía seleccionada sobre 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.

Otras referencias

- 1) **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.
- 2) **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.
- 3) **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.
- 4) **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.

- 5) **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.
- 6) **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.
- 7) **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.
- 8) **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.
- 9) **Steudel 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.
- 10) **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, Diáz 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