

Mentype[®] AMLplex^{QS}

Istruzioni per l'uso

Rilevamento di aberrazioni cromosomiche nella Leucemia mieloide acuta

Diagnostici in vitro



AMLIFU01v2it
Agosto 2019



45-31220-0010
45-31220-0025
45-31220-0100
45-31220-0400



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
D-01109 Dresden
Germany

Made in Germany

Biotype GmbH sviluppa, produce e distribuisce applicazioni a base PCR per la diagnostica medica.

I nostri Mentype® Test Kits garantiscono massimi standard di qualità.

Siamo a disposizione per qualsiasi genere di informazioni e suggerimenti. Non esitate a contattarci o visitate il nostro sito www.biotype.de.

Sommario

1. Impiego appropriato	5
2. Informazioni di base	5
3. Descrizione del prodotto Mentype® AMLplex^{QS}	5
3.1 Strumenti	7
3.2 Tipo di campione	7
4. Avvertenze e istruzioni di sicurezza	8
4.1 Assicurazione della qualità	9
5. Materiali forniti in dotazione	10
5.1 Contenuto del kit	10
5.2 Informazioni per le ordinazioni	10
5.3 Altri reagenti e attrezzature richieste (non in dotazione nel kit)	10
6. Stoccaggio	12
7. Ciclo di lavorazione Mentype® AMLplex^{QS}	13
7.1 Preparazione dei campioni e volume applicativo cDNA	13
7.1.1 Isolamento dell'RNA	13
7.1.2 Trascrizione dell'RNA in cDNA	13
7.1.3 Impiego del Template cDNA	13
7.2 Preparazione del Mastermix	14
7.2.1 Controllo positivo	14
7.2.2 Controllo negativo	15
7.3 Volume di reazione	16
8. Programma PCR e amplificazione.....	17
9. Elettroforesi su gel capillare	18
9.1 Elettroforesi nell'ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer	18
9.1.1 Creazione della matrice	18
9.1.2 Preparazione dei campioni	24
9.1.3 Configurazione del software Data Collection	25
9.2 Elettroforesi nell'analizzatore ABI PRISM® 3100-Avant/3100 Genetic	25
9.2.1 Calibrazione spettrale / Calibrazione della matrice	26
9.2.2 Preparazione dei campioni	28
9.2.3 Configurazione del software Data Collection	29
9.3 Elettroforesi nell'analizzatore ABI PRISM® 3130/3130xl Genetic Analyzer	31
9.3.1 Calibrazione spettrale / Calibrazione della matrice	32
9.3.2 Preparazione dei campioni	36
9.3.3 Configurazione del software Data Collection	36
9.4 Elettroforesi con l'analizzatore ABI PRISM® 3500/3500xL Genetic	39
9.4.1 Calibrazione spettrale / Calibrazione della matrice	40
9.4.2 Preparazione dei campioni	44
9.4.3 Impostazioni per Run	44
10. Valutazione dei dati	48

10.1 Software e modelli di valutazione	48
10.2 Procedura per la valutazione dei dati	49
10.2.1 Requisiti minimi generali per la valutazione dei dati	49
10.2.2 Controllo dello standard di lunghezza Size Standard 550 (BTO)	50
10.2.3 Controllo della scala allelica/Allelic Ladder	50
10.2.4 Verifica del controllo cDNA KAS-1	53
10.2.5 Verifica del controllo negativo	53
10.2.6 Valutazione dei dati dei campioni	54
11. Troubleshooting	56
11.1 Limite di rilevamento	56
11.2 Irradiazioni (Pull-up Peaks)	56
11.3 Attacco di nucleotidi indipendente dal modello	56
11.4 Artefatti	56
11.5 Influsso del tipo di polimero	57
12. Informazioni per le ordinazioni	58
13. Referenze	59
14. Marchi ed esclusione di responsabilità	60
15. Simboli	61
A Convalida analitica	62
A a) Determinazione della reazione standard e tolleranze specifiche al lotto	62
A b) Test della precisione di misurazione	62
A c) Test della specificità analitica	63
A c) a) Test della specificità analitica tramite cDNAs negativamente pre-tipizzati	63
A c) b) Test della specificità analitica tramite cDNA positivamente pre-tipizzato	63
A d) Test della sensibilità analitica	63
A e) Test di vari PCR-Thermal Cyclers	64
A f) Test dell'influsso delle diverse temperature di Annealing nel PCR	64
A g) Test dei diversi carichi tampone PCR	65
A h) Inalterabilità dopo l'apertura	65
B Dati di rendimento clinici	66
B a) Prelevamento campioni, aspetti etici e regolatori	66
B b) Test comparativo	66
B c) Estrazione e purificazione del DNA	66
B d) Risultati	66
B e) Letteratura sui biomarcatori e le loro sequenze DNA	68

Mentype® **AMLplex**^{QS}

1. Impiego appropriato

Il kit Mentype® **AMLplex**^{QS} è destinato alla rilevazione qualitativa di 34 varianti di trascrizione genica, che possono insorgere in alcuni sottotipi di leucemia mieloide acuta (AML) attraverso traslocazioni cromosomiche (mutazioni somatiche) che coinvolgono 11 diverse fusioni geniche.

Le applicazioni Mentype® **AMLplex**^{QS} sono destinate all'uso professionale solo in laboratori specializzati. Il personale deve essere addestrato ed istruito per l'applicazione delle tecnologie PCR e sull'uso dei dispositivi medico-diagnostici in vitro.

2. Informazioni di base

L'individuazione di aberrazioni cromosomiche specifiche è di grande importanza prognostica e quindi essenziale per la diagnosi di leucemia acuta. L'identificazione delle traslocazioni genetiche specifiche consente la classificazione dei sottotipi di leucemia e quindi supporta la terapia adattata al rischio dei pazienti.

Il Kit Mentype® **AMLplex**^{QS} consente la solida identificazione di aberrazioni cromosomiche rilevanti per il trattamento alla base della leucemia mieloide acuta (LMA), come procedura facilmente attuabile nella diagnostica di routine.

3. Descrizione del prodotto Mentype® **AMLplex**^{QS}

Mentype® **AMLplex**^{QS} identifica in un principio multiparametrico 34 varianti di trascrizione dei seguenti geni di fusione: RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL, PICALM-MLLT10, CBFβ-MYH11, DEK-NUP214, KMT2A-MLLT4, KMT2A-MLLT3, KMT2A-ELL, KMT2A-PTD, NPM1-MLF1 e PML-RARA (v. Tabella 1).

I risultati del Mentype® **AMLplex**^{QS} sono assicurati da due controlli interni. Il controllo interno PCR (Quality Sensor "QS-Control") indica il successo della reazione di amplificazione; un "controllo cDNA" (controllo ABL) è annesso al kit per mostrare la qualità del cDNA utilizzato.

In questo test si esegue un'analisi della lunghezza del frammento mediante elettroforesi su gel capillare. I primer sono evidenziati con coloranti fluorescenti **6-FAM**, **BTG** o **BTY**.

Tabella 1 Possono essere rilevate fusioni genetiche e varianti di trascrizione usando il Mentype® AMLplex^{QS}

Funzione genetica	Aberrazione cromosomica	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 Strumenti

I kit Mentype® **AMLplex^{QS}** sono stati verificati e convalidati sui seguenti PCR Cycler:

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

I kit sono stati verificati e convalidati sui seguenti sistemi di elettroforesi su gel capillare utilizzando POP-4™ (Applied Biosystems™) e una lunghezza capillare di 36 cm, è stato verificato anche l'utilizzo di POP-7™:

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

La valutazione dei dati è stata verificata con la seguente versione software:

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

L'applicazione dei kit Mentype® **AMLplex^{QS}** su altri strumenti o software diversi da quelli summenzionati deve essere convalidata e verificata sotto la responsabilità dell'utente.

3.2 Tipo di campione

Mentype® **AMLplex^{QS}** sono stati validati con cDNA trascritto da RNA isolato da sangue intero citrato.

Il prodotto Mentype® **AMLplex^{QS}** è convalidato per l'applicazione di 1 µL cDNA, questo viene trascritto da 1 µg RNA in un volume reattivo di 20 µL. L'applicazione di quantità maggiori di cDNA deve essere convalidata dall'utente.

4. Avvertenze e istruzioni di sicurezza

La seguente sostanza potenzialmente pericolosa è inclusa in questo kit:

Tabella 2 Componenti potenzialmente pericolose dei kit Mentyte® AMLplex^{QS}

Componente del kit	Sostanze chimiche	Pericolo
Mix reattivo A	Azoturo di sodio NaN_3	Nocivo in caso di ingestione, sviluppa gas nocivi nel contatto con acidi

Osservare le schede dei dati di sicurezza (SDS) dei prodotti Biotype®, che possiamo inviarvi volentieri a richiesta (support@biotype.de). Per le schede dei dati di sicurezza dei reagenti che non sono inclusi nel kit di test, si prega di contattare il rispettivo produttore.

Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di utilizzare il prodotto.

Dopo la ricezione, controllare la completezza del prodotto e dei suoi componenti in termini di quantità, tipologia e riempimento (si veda al capitolo 5.1, Contenuto del **kit**), corretta etichettatura, stato congelato dei reagenti e integrità delle confezioni dei reagenti.

Durante l'utilizzo dei quanti Assays è necessario indossare un grembiule da laboratorio, nonché una protezione per gli occhi, qualora necessaria.

Evitare la contaminazione da nucleasi (DNase / RNase) dei campioni, utilizzando puntali monouso senza DNase / RNase con filtri che assorbono l'aerosol.

Utilizzare spazi di lavoro separati per la preparazione del campione (pre-PCR), la preparazione del mastermix nonché la post-elaborazione e l'analisi del campione (post-PCR). Mantenere i controlli positivi fisicamente separati dai componenti del kit.

Potrebbero essere necessari ulteriori controlli in base alle direttive o ai requisiti previsti dalle normative locali, statali e/o federali ovvero delle organizzazioni di accreditamento.

Non utilizzare alcuni componenti del kit che abbiano superato la data di scadenza e non mescolarne i lotti.

Smaltire i rifiuti di campioni e test secondo le norme di sicurezza locali.

4.1 Assicurazione della qualità

L'intero contenuto del kit di test è sottoposto ad un'intensa gestione della qualità da parte di Biotype GmbH. La qualità dei kit di test viene continuamente controllata, per dimostrarne l'usabilità illimitata. Per tutte le questioni riguardanti l'assicurazione della qualità, vogliate contattarci via e-mail all'indirizzo info@biotype.de.

5. Materiali forniti in dotazione

5.1 Contenuto del kit

I kit Mentype® **AMLplex^{QS}** contengono i seguenti componenti, sufficienti per eseguire 10, 25, 100 o 400 reazioni.

Tabella 3 Grandezze delle confezioni e componenti contenuti nei kit Mentype® **AMLplex^{QS}**

Componente del kit / reagente	Volume per grandezza della confezione			
	10 reaz.	25 reaz.	100 reaz.	400 reaz.
Nuclease-free Water	1 x 1,5 mL	1 x 1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	1 x 250 µL	1 x 250 µL	1 x 500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix	1 x 25 µL	1 x 63 µL	1 x 250 µL	4 x 250 µL
MultiTaq2 DNA Polymerase	1 x 10 µL	1 x 10 µL	1 x 40 µL	1 x 160 µL
Control cDNA KAS-1	1 x 10 µL	1 x 10 µL	1 x 10 µL	1 x 10 µL
Allelic Ladder AMLplex	1 x 25 µL	1 x 25 µL	1 x 25 µL	4 x 25 µL
Size Standard 550 (BTO)	1 x 13 µL	1 x 13 µL	1 x 50 µL	1 x 200 µL

5.2 Informazioni per le ordinazioni

Vogliate indirizzare la vostra ordinazione scritta via e-mail all'indirizzo sales@biotype.de. L'ordinazione deve contenere i numeri d'ordine in corrispondenza della Tabella 4 e Tabella 44, pagina 58.

Tabella 4 Numeri d'ordine dei kit Mentype® **AMLplex^{QS}**

Prodotto	Grandezza della confezione	Ord. N.
Mentype® AMLplex^{QS}	10 reazioni	45-31220-0010
Mentype® AMLplex^{QS}	25 reazioni	45-31220-0025
Mentype® AMLplex^{QS}	100 reazioni	45-31220-0100
Mentype® AMLplex^{QS}	400 reazioni	45-31220-0400

5.3 Altri reagenti e attrezzature richieste (non in dotazione nel kit)

Per la calibrazione iniziale dell'attrezzatura per elettroforesi su gel capillare in abbinamento ai coloranti fluorescenti specifici del kit Mentype® **AMLplex^{QS}** è necessario eseguire una calibrazione spettrale con il seguente reagente della ditta Biotype GmbH (Tabella 5):

Tabella 5 Altri reagenti richiesti della Biotype GmbH

Reagente	Applicazione	Grandezza della confezione	Ord. N.
Matrix Standard BT5 single	Calibrazione spettrale del sistema di elettroforesi su gel capillare (un capillare)	5 x 25 µL	00-10411-0025
Matrix Standard BT5 multi	Calibrazione spettrale del sistema di elettroforesi su gel capillare (diversi capillari)	1 x 25 µL.	00-10421-0025
Matrix Standard BT5 multi	Calibrazione spettrale del sistema di elettroforesi su gel capillare (capillari multipli)	2 x 25 µL.	00-10421-0050

Il kit richiede i seguenti materiali e strumenti generali per l'esecuzione:

- Centrifuga da tavolo con rotore per provette di reazione da 2 mL
- Piastre di reazione 96-Well o tubetti di reazione da 0,2 mL, coperchi o pellicole adatte per l'utilizzo di piastre di reazione 96-Well, una centrifuga con rotore per piastre di microlitri
- Miscelatore Vortex, adatto per piastre di reazione 96-Well o provette di reazione da 0,2 mL
- Pipette, puntali per pipette con filtri (usa e getta)
- Guanti usa e getta senza talco
- Kit di isolamento RNA adatto (si veda il capitolo 7.1.1, Isolamento dell'RNA)
- Strumento adatto per la misurazione quantitativa della concentrazione di RNA dopo l'isolamento e la purificazione (si veda il capitolo 7.1.1, Isolamento dell'RNA)
- Kit adatto per la trascrizione dell'RNA in cDNA (si veda 7.1.2, Trascrizione dell'RNA in cDNA)
- Blocco di ghiaccio per uno stoccaggio abbreviato della polimerasi
- PCR Cycler adatto (si veda il capitolo 3.1, Strumenti)
- Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems™)
- Reagenti e materiali di consumo del sistema di elettroforesi su gel capillare
- Strumento adatto per l'elettroforesi su gel capillare (si veda il capitolo 3.1, Strumenti)

Nota: Accertarsi che tutte le apparecchiature siano installate, mantenute e calibrate secondo le prescrizioni dei produttori. Accertarsi che siano disponibili tutti i reagenti per il funzionamento del rispettivo strumento di PCR ed elettroforesi su gel capillare (si vedano le istruzioni per l'uso del rispettivo produttore del dispositivo).

6. Stoccaggio

I kit Mentype® **AMLplex^{QS}** vengono spediti in ghiaccio secco. I componenti dei kit arrivano congelati. Qualora uno o più componenti non dovessero essere consegnati in stato congelato o i tubi risultassero danneggiati durante il trasporto, contattare immediatamente la Biotype GmbH (support@biotype.de) per le ulteriori misure di assistenza.

Lo stoccaggio dei componenti deve avvenire ad un campo di temperature compreso fra -25 °C e -15 °C. Il cDNA di controllo e i reagenti post-PCR (alleli e DNA di lunghezza standard BTO) devono essere conservati separatamente dai reagenti PCR.

Evitare frequenti scongelamenti e congelamenti. Non è consentito superare il massimo numero di 20 cicli di scongelamento/congelamento.

I kit Mentype® **AMLplex^{QS}** vanno conservati in un luogo protetto dalla luce.

La data di scadenza dei kit di test è indicata sull'etichetta della confezione.

7. Ciclo di lavorazione Mentype® AMLplex^{QS}

7.1 Preparazione dei campioni e volume applicativo cDNA

7.1.1 Isolamento dell'RNA

La qualità dell'RNA isolato influisce in modo decisivo sul rendimento e la qualità dell'intero sistema di test. In linea di massima è necessario accertarsi che il sistema utilizzato per l'isolamento dell'RNA sia compatibile con la tecnologia PCR.

I seguenti kit sono stati testati per l'isolamento dell'RNA e quindi adatti all'uso:

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

L'uso di kit di isolamento RNA alternativi deve essere convalidato sotto la propria responsabilità dell'utente.

Nota: Per risultati accurati, è richiesta la quantificazione dell'RNA (ad es. mediante quantificazione dell'RNA spettroscopico UV/VIS a 260 nm e determinazione della qualità secondo A260 / rapporto A280, che dovrebbe essere compreso tra 1,7 e 2,0).

7.1.2 Trascrizione dell'RNA in cDNA

Dopo l'isolamento e la quantificazione dell'RNA, la trascrizione in cDNA viene effettuata utilizzando kit disponibili in commercio. Un'applicazione di RNA pari a 1 µg è stata convalidata in un principio di reazione di 20 µL come reazione di trascrizione.

I seguenti kit sono stati testati per la trascrizione e quindi adatti all'uso:

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

L'uso di kit di trascrizione alternativi deve essere convalidato sotto la propria responsabilità dell'utente.

7.1.3 Impiego del Template cDNA

Il kit Mentype® AMLplex^{QS} è stato ottimizzato per l'utilizzo di 1 µL cDNA (senza diluizione), a sua volta preparato come descritto nella sezione 7.1.2.

La quantità di cDNA-Template può essere aumentata in caso di campioni critici dei pazienti. Si dovrebbe applicare un massimo di 1/10 di volume della reazione RT. Nel principio di reazione del kit Mentype® AMLplex^{QS} è necessario correggere il volume di acqua esente da nucleasi, in modo che il volume totale del principio PCR corrisponda sempre a 25 µL. Questa procedura deve essere convalidata sotto la propria responsabilità dell'utente.

7.2 Preparazione del Mastermix

Tutti i reagenti devono essere ben miscelati (su vortex) e brevemente centrifugati (ca. 10 s). Conservare la polimerasi Multi Taq2 DNA su un blocco di ghiaccio durante l'operazione.

Il volume totale del principio PCR deve corrispondere sempre a 25 µL.

Considerare i controlli positivi e negativi per il numero di reazioni PCR. Aggiungere una o due reazioni al totale, per compensare eventuali errori di pipettatura.

La panoramica seguente mostra i volumi dei componenti del kit usati con un volume del campione pari a 1,0 µL (Template-cDNA) e un volume di reazione pari a 25 µL.

Tabella 6 Principio Mastermix per una reazione Mentype® **AMLplex^{QS}** utilizzando 1 µL cDNA

Componente	Volume per principio PCR
Nuclease-free Water	16,1 µL
Reaction Mix A*	5,0 µL
Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Volume complessivo del Mastermix	24,0 µL
Template cDNA	1,0 µL

* contiene Mg²⁺, dNTPs, BSA

7.2.1 Controllo positivo

Diluire il controllo positivo cDNA KAS-1 incluso nel kit anzitutto su 250 ng/µL con acqua priva di nucleasi.

Per il controllo positivo, al posto del Template-cDNA 1 µL, utilizzare il controllo positivo diluito cDNA KAS-1. Pipettare il cDNA di controllo al posto del Template-cDNA nelle provette di reazione con il master mix PCR.

La panoramica seguente mostra i volumi dei componenti del kit usati con un volume del campione pari a 1,0 µL di cDNA di controllo e un volume di reazione pari a 25 µL.

Tabella 7 Principio Mastermix per una reazione Mentype® **AMLplex^{QS}** utilizzando 1 µL di campione di controllo positivo

Componente	Volume per principio PCR
Nuclease-free Water	16,1 µL
Reaction Mix A *	5,0 µL
Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Volume complessivo del Mastermix	24,0 µL
Control cDNA KAS-1	1,0 µL

* contiene Mg²⁺, dNTPs, BSA

7.2.2 Controllo negativo

Come controllo negativo (No Template Control) pipettare 1 µL di acqua senza nucleasi al posto del Template-cDNA nelle provette di reazione con il PCR Mastermix.

La panoramica seguente mostra i volumi dei componenti del kit usati con 1 µL „Nuclease-free Water“ e un volume di reazione di 25 µL.

Tabella 8 Principio Mastermix del controllo negativo per una reazione Mentype® **AMLplex^{QS}**

Componente	Volume per attacco PCR
Nuclease-free Water	16,1 µL
Reaction Mix A *	5,0 µL
Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix	2,5 µL
Multi Taq2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Volume complessivo del Mastermix	24,0 µL
Controllo negativo Nuclease-free Water	1,0 µL

* contiene Mg²⁺, dNTPs, BSA

Inoltre, un cDNA negativo già noto per le fusioni e le traslocazioni del gene rilevabile può essere incluso come controllo negativo. Questo deve essere elaborato come un campione normale e utilizzato nel PCR come reazione aggiuntiva.

7.3 Volume di reazione

Pipettare 24 μL di PCR Mastermix nelle provette di reazione o nella piastra Multiwell. Aggiungere successivamente 1 μL di cDNA o 1 μL di controllo positivo ossia negativo.

Dopo la pipettazione, è necessario chiudere le provette di reazione ovvero le piastre Multiwell. Miscelare e centrifugare brevemente le mix di reazione e aggiungerle quindi al PCR-Cycler per l'amplificazione.

8. Programma PCR e amplificazione

Per attivare la polimerasi Multi Taq2 DNA e sopprimere la formazione di prodotti di amplificazione non specifici, è essenziale eseguire un „hot start“.

Per determinare il numero ottimale di cicli PCR richiesti, il controllo ABL interno può essere applicato come riferimento. Di conseguenza, non è consentito superare il livello di picco del campo di misurazione specificato del dispositivo (ad esempio, da 500 a 5000 RFU nell'ABI 3130).

A causa dell'insufficiente concentrazione di cDNA, possono verificarsi dropout allelici e sbilanciamenti dei picchi. Con un crescente numero di cicli cresce anche la probabilità di prodotti di amplificazione non specifici.

Nota: Per un bilanciamento ottimale del kit, le velocità di riscaldamento o raffreddamento dei dispositivi PCR dovrebbero essere regolate a 4 °C/s.

Tabella 9 Parametro di amplificazione PCR per l'esecuzione Mentype® AMLplex^{QS}

Temperatura	Tempo	Numero di cicli
96 °C	4 min	1 x (hot start per attivare la polimerasi Multi Taq2 DNA)
96 °C	30 s	
61 °C	120 s	22 - 28 x
72 °C	75 s	
68 °C	10 min*	1 x
10 °C	∞	hold

* Qualora dovessero verificarsi dei livelli di picco di adenina (-1 bp) elevati, si potrà estendere quest'operazione al massimo a 60 minuti.

Il numero dei cicli di PCR dipende sostanzialmente dalla quantità di cDNA utilizzata e dal livello di espressione della variante di trascrizione da rilevare. Sono stati testati cicli compresi fra 22 e 28. Per i campioni di riferimento da materiale di coltura cellulare (tassi di alta espressione), si consiglia una riduzione dei cicli PCR a 22. Per raggiungere la massima sensibilità (11.1 Limite di rilevamento), si consiglia di utilizzare il numero massimo di cicli pari a 28.

9. Elettroforesi su gel capillare

9.1 Elettroforesi nell'ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer

Le istruzioni generali per l'analizzatore, la creazione della matrice e l'applicazione del software GeneMapper™ possono essere consultate nel rispettivo manuale *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer User's Manual*. In seguito si descrive l'elettroforesi con il software GeneMapper™ ID-X.

Per un impiego combinato dei cinque coloranti fluorescenti **6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO** è previsto l'utilizzo del **Filter Set G5** virtuale (lo standard della matrice viene denominato in seguito **BT5**).

Tabella 10 Materiali necessari per l'utilizzo dell'analizzatore ABI 310 Genetic

Materiali	Proprietà
Capillari	47 cm / 50 µm (verde)
Polimero	POP-4™ for 310 Genetic Analyzer
Tampone	10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA

9.1.1 Creazione della matrice

Prima di eseguire l'analisi della lunghezza del frammento con il set Filter Set G5, è innanzitutto necessario preparare una matrice con frammenti PCR dei corrispondenti cinque coloranti fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO per il rispettivo analizzatore.

Tabella 11 Denominazione dei colori dello standard di matrice BT5 singolo e appartenente al canale corrispondente

Colore	Matrix Standard
Blue (B)	6-FAM
Green (G)	BTG
Yellow (Y)	BTY
Red (R)	BTR
Orange (O)	BTO

Per la preparazione di file di matrice idonei, vengono eseguite cinque elettroforesi alle medesime condizioni applicate ai campioni e alle scale alleliche del kit di test. Per ciascuno

dei cinque diversi coloranti fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO è necessario eseguire un ciclo di elettroforesi separata.

Tabella 12 Principio dello standard di matrice BT5 singola per creare una matrice sull'analizzatore ABI 310 Genetic

Campione Matrix	Componenti	Volume
Campione Matrix 1	Hi-Di™ formammide	12,0 µL
	Matrix Standard 6-FAM	1,0 µL
Campione Matrix 2	Hi-Di™ formammide	12,0 µL
	Matrix Standard BTG	1,0 µL
Campione Matrix 3	Hi-Di™ formammide	12,0 µL
	Matrix Standard BTY	1,0 µL
Campione Matrix 4	Hi-Di™ formammide	12,0 µL
	Matrix Standard BTR	1,0 µL
Campione Matrix 5	Hi-Di™ formammide	12,0 µL
	Matrix Standard BTO	1,0 µL

- Denaturare i campioni a 95 ° C per 3 min in un PCR Cycler, raffreddare i campioni nello strumento a 4°C
- Posizionare i campioni nel dispositivo per l'analisi secondo le istruzioni del produttore dell'apparecchio
- Creare e selezionare l'elenco dei campioni **Sample Sheet, 5 Dyes** e denominare campioni.

Lista di iniezioni per la creazione della matrice

Tabella 13 Parametri per la creazione della matrice nell'analizzatore ABI 310 Genetic

Parametri	Impostazione
Module File	GS STR POP-4 (1 mL) G5
Matrix File	NONE
Size Standard*	NONE
Injection [s]	5
Injection [kV]	15.0
Run [kV]	15.0
Run [°C]	60
Run Time [min]	24

* Preparare sempre gli standard di matrice **senza standard di lunghezza DNA (BTO)**

Analisi dei campioni di matrice

- Avviare il software GeneMapper™
- **File → Add Samples to Project** (aprire la cartella del rispettivo ciclo)
- Cliccare nella cartella dei campioni nell'area sinistra della schermata
- Marcare la matrice del campione → **Raw Data** (nell'area destra della schermata)
- Verificare se è presente una linea di base stabile. Come mostrato nella Figura 1, dovrebbero essere riconoscibili almeno cinque picchi con livelli compresi fra 1.000 - 4.000 RFU (asse Y) in ogni campione di matrice (campo ottimale: 2.000-4.000 RFU)

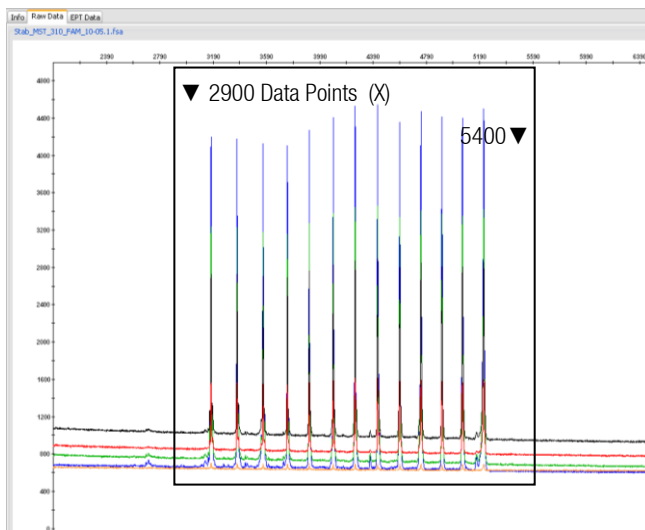


Figura 1 Elettroferogramma dei dati grezzi dello standard di matrice BT5 singolo sull'analizzatore ABI 310 Genetic

- Selezione del campo di analisi con base stabile e piatta
- Qualora la linea di base dovesse risultare troppo irrequieta, iniettare nuovamente il campione della matrice
- Prendere nota dei punti iniziali e finali (Data Points) del campo di selezione, ad esempio, valore iniziale 2.900, valore finale 5.400
- Calcolare il valore differenziale, p. es. $5.400 - 2.900 = 2.500$ Data Points

Creare una nuova matrice

- **Tools** → **GeneMapper Manager** → **Matrices** → **New**
- Denominazione della matrice, ad esempio Matrix BT5
- sotto **Matrix Settings** Importare i campioni di matrice per ciascun colore (B, G, Y, R, O), cliccando sull'icona colorata

Matrix Editor

Matrix Description

Matrix Name:

Security Group: GeneMapper ID-X Security Group

Description:

Matrix Settings

Select the Matrix Standard Sample File: No File Selected for "B" Data No File Selected for "G" Data No File Selected for "Y" Data No File Selected for "R" Data No File Selected for "O" Data

Number of Dyes: 5

Start At: 1000

Start At: 1000

Start At: 1000

Start At: 1000

Start At: 1000

Points: 100000

Matrix Result

	B	G	Y	R	O
B	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
G	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Y	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
R	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
O	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Figura 2 Selezione dei campioni di matrice con punto di partenza e immissione del valore differenziale

- Registrare il rispettivo punto iniziale in **Start At**, p. es. 2.900
- Registrare il valore differenziale raggiunto, p. es. 2.500 in **Points**

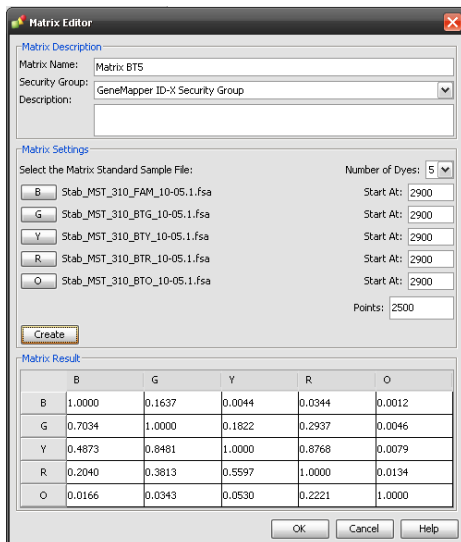


Figura 3 File di matrice finiti inseriti nonché dimensione di passo

- con **Create** viene calcolata la nuova matrice
- con **OK** viene salvata la nuova matrice

Verifica della matrice

- Verificare la nuova matrice con il campione attuale.
- **File → Add Samples to Project** (aprire la cartella del rispettivo ciclo)
→ **Add Sample Files**
- selezionare la nuova matrice generata nella tabella
- Analizzare di nuovo i campioni

Con la nuova matrice non dovrebbero verificarsi **alcune** irradiazioni (Pull-up Peaks) tra i diversi pannelli colorati (B, G, Y, R, O).

9.1.2 Preparazione dei campioni

Tabella 14 Principio della miscela standard di formamide per reazioni di elettroforesi su gel capillare

Componenti	Volume per reazione
Hi-Di™ formammide	12,0 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µL

- Preparare 12 µL di miscela dalla Tabella 14 per tutti i campioni
- Aggiungere per ciascun Well 1 µL di prodotto PCR (ev. diluito) o allele purulento alla miscela
- Denaturare i campioni a 95 °C per 3 min in un PCR Cycler, raffreddare i campioni nello strumento a 4 °C
- Posizionare i campioni nel dispositivo per l'analisi secondo le istruzioni del produttore dell'apparecchio

La temperatura ambiente può influenzare notevolmente la dinamica di marcia dei prodotti PCR e comportare dei doppi picchi (Split Peaks) se la temperatura risulta essere troppo bassa. In determinate circostanze, la temperatura influenza anche la velocità di corsa dei frammenti. Accertarsi di rispettare sempre la temperatura operativa raccomandata dai produttori dei dispositivi. Sono considerate ottimali temperature ambiente stabili di >22 °C.

Possibilità di incrementare le intensità di segnale:

- Riduzione delle quote nel DNA lunghezza standard 550 (BTO) a livelli di picco di ca. 500 unità di fluorescenza relative (RFU)
- Purificazione dei prodotti PCR prima dell'analisi

9.1.3 Configurazione del software Data Collection

- Creare un elenco dei campioni **Sample Sheet** e denominare i campioni

Elenco di iniezioni

Tabella 15 Parametri per la creazione dell'elenco di iniezioni dell'analizzatore ABI 310 Genetic per l'analisi dei campioni

Parametri	Impostazioni
Module File	GS STR POP-4 (1 mL) G5
Matrix File	p. es. Matrix BT5
Size Standard	p. es. SST-BTO_60-550bp
Injection [s]*	5
Injection [kV]	15.0
Run [kV]	15.0
Run [°C]	60
Run Time [min]**	28

* Differentemente dall'impostazione standard, il tempo di iniezione può variare tra 1 e 20 s, a seconda del campione. Se si tratta di campioni di confronto con livelli di picco molto elevati, è possibile scegliere un tempo di iniezione più breve, per evitare delle irradiazioni. In piccole quantità di cDNA ossia materiali critici dei pazienti, può essere richiesto un tempo fino a 20 s.

** A seconda delle condizioni di analisi, il tempo di esecuzione dovrebbe essere adattato specificamente per Mentype® **AMLplex^{QS}**, in modo da poter analizzare frammenti fino ad una lunghezza di **550 bp**.

9.2 Elettroforesi nell'analizzatore ABI PRISM® 3100-Avant/3100 Genetic

Le istruzioni generali per l'analizzatore, la calibrazione spettrale e l'applicazione del software ABI PRISM® 3100 Data Collection Versione 1.01 o 1.1 nonché del software GeneScan® possono essere consultate nel rispettivo manuale *ABI PRISM® 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer User's Manual*. Per sistemi in abbinamento al software Data Collection 2.0 o 3.0 consultare il capitolo 6.

Il sistema a 4 capillari si chiama ABI 3100-Avant, il sistema a 16 capillari è chiamato ABI 3100.

Per un impiego combinato dei cinque coloranti fluorescenti **6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO** è previsto l'utilizzo del **Filter Set G5** virtuale (lo standard della matrice viene denominato in seguito **BT5**).

Tabella 16 Materiali necessari per l'utilizzo dell'analizzatore ABI 3100 Genetic

Materiali	Proprietà
Capillari*	36 cm Capillary Array for 3100-Avant/3100
Polimero*	POP-4™ Polymer for 3100
Tampone	10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA

*Sono possibili altre configurazioni dei dispositivi

9.2.1 Calibrazione spettrale / Calibrazione della matrice

Prima di eseguire l'analisi della lunghezza del frammento, è necessario eseguire prima calibrazione spettrale nell'analizzatore ABI PRISM® 3100-Avant/3100 Genetic. In questo modo si crea una matrice, che corregge la sovrapposizione degli spettri di emissione di fluorescenza specifici ai colori.

La calibrazione spettrale è suddivisa nelle fasi seguenti:

- Preparazione dello standard della matrice per la calibrazione spettrale
- Caricamento dello standard nella piastra 96-Well (un campione per capillare)
- Immettere la composizione della piastra
- Eseguire la corsa per la calibrazione spettrale e verificare la matrice

Preparazione dello standard della matrice per la calibrazione spettrale

Preparare la miscela di HiDi™ formammide e lo standard di matrice BT5 multi.

Tabella 17 Principio dello standard di matrice BT5 multi per l'analizzatore ABI 3100 Genetic

Componenti	Volume per 4 capillari (ABI 3100-Avant)	Volume per 16 capillari (ABI 3100)
Hi-Di™ formammide	60,0 µL	204,0 µL
Matrix Standard BT5	5,0 µL	17,0 µL
Posizione	A1-D1	A1-H1 e A2-H2

- Caricare 12 µl di miscela nella piastra 96-Well (per la posizione specifica, si veda la Tabella 17)
- Denaturare i campioni a 95 °C per 3 min in un PCR Cycler, raffreddare i campioni nello strumento a 4 °C
- Posizionare i campioni nel dispositivo per l'analisi secondo le istruzioni del produttore dell'apparecchio

Eseguire la calibrazione spettrale

Per eseguire una calibrazione di successo con la versione software Data Collection 1.0.1 o 1.1, è necessario innanzitutto modificare una volta il **parametro** della calibrazione spettrale per **DyeSetG5**.

Spectral Parameter

- Modifica delle impostazioni dei parametri nel percorso:
D:\AppliedBio\Support Files\Data Collection Support Files\CalibrationData\Spectral Calibration\ParamFiles
- Selezionare **MtxStd{Genescan_SetG5}**, per aprire il file PAR
- Modificare il **Condition Bounds Range** a [1.0;20.0]
- Selezionare **File Save As**, per salvare il file parametri con un nuovo nome, p. es. MtxStd{Genescan_SetG5_BT5}.par

Utilizzare per la calibrazione spettrale con la matrice standard Biotype® **BT5** sempre il file del parametro appena creato.

Editor piastre per la calibrazione spettrale (I)

- Inserire la piastra 96-Well preparata nell'Autosampler
- Aprire il software ABI PRISM® 3100 Data Collection
- Cliccare in **Plate View** del software 3100 Data Collection su **New**, per aprire il **Plate Editor Dialog**
- Immettere il nome della piastra
- Selezionare **Spectral Calibration**
- Selezionare il tipo di piastra **96-Well** e successivamente **Finish**

Editor piastre per la calibrazione spettrale (II)

Tabella 18 Parametri nell'editor piastre per la calibrazione spettrale

Parametri	Impostazione
Sample Name	Denominazione dei campioni di matrice
Dye Set	G5
Spectral Run Module	<i>Default</i> (p. es. Spect36_POP4)
Spectral Parameters	MtxStd{GeneScan_SetG5_BT5}.par (parametro precedentemente creato)

- Cliccare nella cella superiore della tabella, per selezionare l'intera colonna, aggiungere le informazioni ai campioni di matrice selezionati tramite **Edit** → **Fill Down** e confermare infine con **OK**
- Concatenare la piastra 96-Well con la denominazione appena creata del campione tramite l'Autosampler e avviare il ciclo
- Dopo il ciclo in **Spectral Calibration Result**, controllare se tutti i capillari sono stati calibrati correttamente (evidenziazione **A**). In caso di un'evidenziazione con una **X** sarà necessario attenersi alle istruzioni riportate nell'*ABI PRISM® Genetic Analyzer User's Manual*
- Cliccare su **OK**, per confermare il ciclo

Verifica della matrice

- Selezionare **Tools** → **Display Spectral Calibration** → **Dye Set** → **G5**, per controllare la calibrazione spettrale di ciascun capillare
- Ogni capillare dovrebbe presentare un valore di qualità (**Q Value**) di almeno 0.95 nonché un coefficiente di condizione (**C Value**) compreso fra 1 e 20. Ambedue i valori devono trovarsi nel campo precedentemente definito
- Verificare se è presente una linea di base stabile. Devono essere riconoscibili cinque picchi con livelli di picco compresi fra 1.000 e 5.000 RFU (asse Y) in ogni capillare (campo ottimale: 2.000-4.000 RFU)
- Verificare la nuova matrice con il campione attuale. Con la nuova matrice non dovrebbero verificarsi alcune irradiazioni (Pull-up Peaks) tra i diversi pannelli colorati (B, G, Y, R, O)
- Se tutti i capillari hanno superato correttamente la calibrazione, il file di calibrazione attuale per **Dye Set G5** in **Tools** → **Set Active Spectral Calibration** dovrà essere attivato manualmente. È anche possibile rinominare la definizione attraverso **Set Matrix Name** (p. es. BT5_Data della calibrazione)
- Se la calibrazione non ha avuto esito positivo, provare a reintrodurre i campioni con un maggiore tempo di iniezione o intensità di corrente. A tal fine è richiesta una modifica dello Spectral Run Module. I campioni possono essere reiniettati fino a tre volte. In caso contrario, è anche possibile utilizzare più standard di matrice per la calibrazione.

9.2.2 Preparazione dei campioni

Tabella 19 Principio di campione per la preparazione all'elettroforesi su gel capillare

Componenti	Volume per reazione
Hi-Di™ formammide	12,0 µL
DNA Size Standard 550 (BT0)	0,5 µL

- Preparare 12 µL di miscela dalla Tabella 19 per tutti i campioni

- Aggiungere per ciascun Well 1 μL di prodotto PCR (ev. diluito) o allele purulento alla miscela
- Denaturare i campioni a 95 °C per 3 min in un PCR Cycler, raffreddare i campioni nello strumento a 4 °C
- Posizionare i campioni nel dispositivo per l'analisi secondo le istruzioni del produttore dell'apparecchio

Poiché l'iniezione avviene nello stesso momento in tutti i capillari, sulla piastra del dispositivo multicapillare è necessario pipettare sempre 4 o 16 campioni. Qualora si dovessero misurare meno campioni, le posizioni libere dei campioni devono essere riempite con 12 μL Hi-Di™ formammide.

Al fine di garantire un'assegnazione sicura di alleli sul dispositivo multicapillare, sono richieste più scale alleliche, indipendentemente dal numero di campioni.

La temperatura ambiente può influenzare notevolmente la dinamica di marcia dei prodotti PCR nei dispositivi multicapillari e comportare dei doppi picchi (Split Peaks) se la temperatura risulta essere troppo bassa. In determinate circostanze, la temperatura influenza anche la velocità di corsa dei frammenti. Accertarsi di rispettare sempre la temperatura operativa raccomandata dai produttori dei dispositivi. Sono considerate ottimali temperature ambiente stabili di >22 °C.

Possibilità di incrementare le intensità di segnale:

- Riduzione della quota nel DNA lunghezza standard 550 (BTO) a livelli di picco di ca. 500 unità di fluorescenza relative (RFU)
- Purificazione dei prodotti PCR prima dell'analisi

9.2.3 Configurazione del software Data Collection

Prima della primissima esecuzione, è necessario che il modulo Run preimpostato nel **Dye Set G5** venga editato una volta:

- Per aprire la finestra di dialogo, cliccare su **Module Editor**
- Selezionare nella tabella **GeneScan** il rispettivo **Run Module** come modello
- Variare la tensione (**Injection Voltage**) a 3 kV e il tempo di iniezione (**Injection Time**) a 10 s

Run Module 3 kV_10 s_550 bp

Tabella 20 Configurazione del modulo Run per l'analisi dei campioni

Parametri	Impostazione
Run Temperature [°C]	<i>Default</i>
Cap Fill Volume	<i>Default</i>
Maximum Current [A]	<i>Default</i>
Current Tolerance [A]	<i>Default</i>
Run Current [A]	<i>Default</i>
Voltage Tolerance [kV]	<i>Default</i>
Pre Run Voltage [kV]	<i>Default</i>
Pre Run Time [s]	<i>Default</i>
Injection Voltage [kV]	3.0
Injection Time [s]*	10
Run Voltage [kV]	<i>Default</i>
Number of Steps	<i>Default</i>
Voltage Step Interval	<i>Default</i>
Data Delay Time [s]	<i>Default</i>
Run Time [min]**	26

* Differentemente dall'impostazione standard, il tempo di iniezione può variare tra 1 e 20 s, a seconda del campione. Se si tratta di campioni di confronto con livelli di picco molto elevati, è possibile scegliere un tempo di iniezione più breve, per evitare delle irradiazioni. In piccole quantità di cDNA ossia materiali critici dei pazienti, può essere richiesto un tempo fino a 20 s.

** A seconda delle condizioni di analisi, il tempo d'esecuzione dovrebbe essere adattato specificamente per Mentype® **AMLplex^{QS}**, in modo da poter analizzare frammenti fino ad una lunghezza di **550 bp**.

- Cliccare su **Save As**, immettere il nome del modulo nuovo (p. es. 3kV_10s_550bp) e confermare successivamente con **OK**
- Per uscire dal **Run Module Editor**, cliccare su **Close**

Avviare Run

- Inserire la piastra 96-Well preparata nell'Autosampler
- Aprire il software ABI PRISM® 3100 Data Collection
- Cliccare in **Plate View** del software 3100 Data Collection su **New**, per aprire la finestra di dialogo **Plate Editor**
- Selezionare **GeneScan**

- Selezionare il tipo di piastra **96-Well** e successivamente **Finish** nell'**Editor piastre**

Tabella 21 Parametri dell'editor piastre per l'analisi dei dati

Parametri	Impostazioni
Sample Name	Denominazione dei campioni
Dyes	0
Color Info	Ladder o sample
Project Name	p. es. 3100_Project1
Dye Set	G5
Run Module*	3kV_10s_550bp
Analysis Module 1	DefaultAnalysis.gsp

* Per i parametri, si veda sopra

- Completare la tabella nell'**Plate Editor** confermare con **OK**
- Cliccare nella cella superiore della tabella, per selezionare l'intera colonna, aggiungere le informazioni ai campioni di matrice selezionati tramite **Edit** → **Fill Down**
- Concatenare la piastra 96-Well con la denominazione appena creata del campione tramite l'Autosampler e avviare il ciclo
- Dopo il ciclo, si possono ritrovare i dati come **Color Data** in **Array View** nel software 3100 Data Collection o come **Analyzed Sample Files** nel direttorio D:/AppliedBio/3100/DataExtractor/ExtractRuns

9.3 Elettroforesi nell'analizzatore ABI PRISM® 3130/3130xl Genetic Analyzer

Le istruzioni generali per l'analizzatore, la calibrazione spettrale e l'applicazione del software ABI PRISM® Data Collection Versione 3.0 e del software GeneMapper™ ID/ID-X possono essere consultate nel rispettivo manuale *ABI PRISM® 3130/3130xl Genetic Analyzers Getting Started Guide*.

Il sistema a 4 capillari si chiama ABI 3130, il sistema a 16 capillari è chiamato ABI 3130xl.

Per un impiego combinato di cinque coloranti fluorescenti **6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO** è previsto l'utilizzo del **Filter Set Any5Dye** virtuale (lo standard della matrice viene denominato in seguito **BT5**).

Tabella 22 Materiali necessari per l'utilizzo dell'analizzatore ABI 3130 Genetic

Materiale	Proprietà
Capillari*	36 cm Capillary Array for 3130/3130xl
Polimero*	POP-4™ Polymer for 3130
Buffer	10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA

*Sono possibili altre configurazioni dei dispositivi

9.3.1 Calibrazione spettrale / Calibrazione della matrice

Prima di eseguire l'analisi della lunghezza del frammento, è necessario eseguire innanzitutto una calibrazione spettrale con i frammenti PCR dei rispettivi coloranti fluorescenti

6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO per il rispettivo analizzatore. In questo modo si crea una matrice, che corregge la sovrapposizione degli spettri di emissione di fluorescenza specifici ai colori.

La calibrazione spettrale è suddivisa nelle fasi seguenti:

- Preparazione dello standard della matrice per la calibrazione spettrale
- Caricamento dello standard nella piastra 96-Well (un campione per capillare)
- Creazione dell'Instrument Protocol per la calibrazione spettrale (Protocol Manager)
- Impostare la composizione della piastra nell'editor piastre (Plate Manager)
- Eseguire la corsa per la calibrazione spettrale e verificare la matrice

Preparazione degli standard della matrice per la calibrazione spettrale

Tabella 23 Principio dello standard di matrice BT5 multi per l'analizzatore ABI 3130 Genetic

Componenti	Volume per 4 capillari	Volume per 16 capillari
	(ABI 3130)	(ABI 3130xl)
Hi-Di™ formammide	60,0 µL	204,0 µL
Matrix Standard BT5	5,0 µL	17,0 µL
Posizione	A1-D1	A1-H1 e A2-H2

- Caricare 12 µl di miscela nella piastra 96-Well (per la posizione specifica, si veda la Tabella 23)
- Denaturare i campioni a 95 °C per 3 min in un PCR Cycler, raffreddare i campioni nello strumento a 4 °C

- Posizionare i campioni nel dispositivo per l'analisi secondo le istruzioni del produttore dell'apparecchio

Eeguire la calibrazione spettrale

- Inserire la piastra 96-Well preparata nell'Autosampler
- Cliccare nel **Protocol Manager** del software Data Collection Software all'interno della finestra **Instrument Protocol** su **New**, per aprire il **Protocol Editor**

Instrument-Protocol per la calibrazione spettrale

Tabella 24 Impostazioni per la calibrazione spettrale nell'analizzatore ABI 3130 Genetic

Protocol Editor	Impostazioni
Nome	<i>User</i> (p. es. Spectral36_POP4_BT5)
Tipo	SPECTRAL
Dye Set	Any5Dye
Polimero*	<i>User</i> (p. es. POP4)
Array Length*	<i>User</i> (p. es. 36 cm)
Chemistry	Matrix Standard
Run Module*	<i>Default</i> (p. es. Spect36_POP4_1)

* Si riferisce al tipo di polimero utilizzato e alla lunghezza del capillare

- Selezionare **Ok, per uscire dal Protocol Editor**
- Cliccare nel **Plate Manager** del software Data Collection su **New**, per aprire il **New Plate Dialog**

Editor piastre per la calibrazione spettrale (I)

Tabella 25 Impostazioni nell'editor piastre per la calibrazione spettrale

New Plate Dialog	Impostazioni
Nome	p. es. Spectral_BT5_date
Application	Spectral Calibration
Plate Type	96-Well
Owner Name / Operator Name	...

- Selezionare **OK**. In questo modo si apre automaticamente la nuova tabella nell'editor piastre

Editor piastre per la calibrazione spettrale (II)

Tabella 26 Denominazione dei campioni per la calibrazione spettrale

Parametri	Impostazioni
Sample Name	Denominazione dei campioni di matrice
Priority	p. es. 100
Instrument Protocol 1	Spectral36_POP4_BT5 (impostazione precedentemente descritta)

- Cliccare nella cella superiore della tabella, per selezionare l'intera colonna, aggiungere le informazioni dei campioni di matrice selezionati tramite **Edit** → **Fill Down** e confermare infine con **OK**
- Cliccare in **Run Schedule** → **Find All**, dopodiché selezionare **Link**, per concatenare la piastra 96-Well con la denominazione della piastra appena creata all'Autosampler (posizione A o B). Avviare successivamente il ciclo

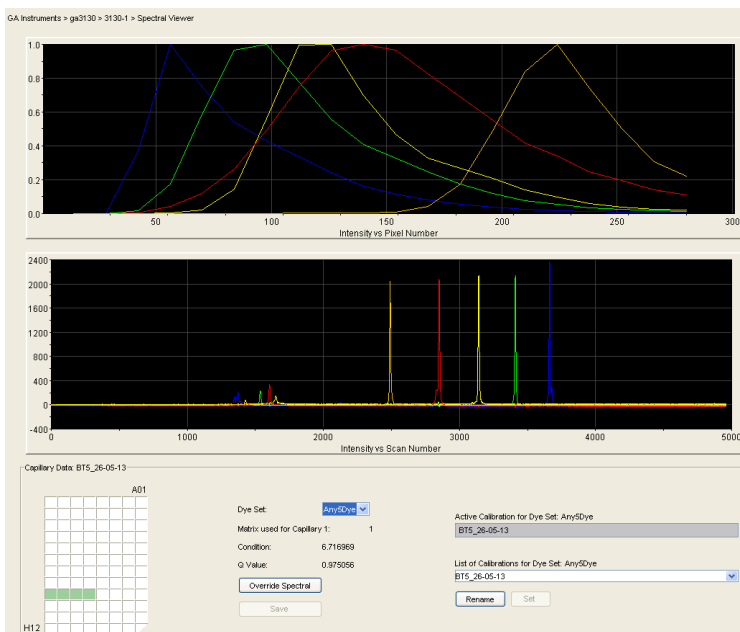


Figura 4 Elettroferogramma per spettroscopia sull'analizzatore genetico ABI 3130 con matrice standard BT5 multi

Verifica della matrice

- Ogni capillare dovrebbe presentare un valore di qualità (**Q Value**) di almeno 0.95 nonché un coefficiente di condizione (**Condition number range**) compreso fra 1 e 20 (Figura 4).
- Verificare se è presente una linea di base stabile. Devono essere riconoscibili cinque picchi con livelli di picco compresi fra 1.000 e 5.000 RFU (asse Y) in ogni capillare (campo ottimale: 2.000-4.000 RFU), si veda la figura.
- Verificare la nuova matrice con il campione attuale. Con la nuova matrice non dovrebbero verificarsi **alcune** irradiazioni (Pull-up Peaks) tra i diversi pannelli colorati (B, G, Y, R, O).
- Se tutti i capillari hanno superato correttamente la calibrazione, il file di calibrazione attuale per **Any5Dyes** nello **Spectral Viewer** verrà attivato automaticamente. È anche possibile rinominare la definizione attraverso **Rename** (p. es. BT5_Data della calibrazione).
- Se la calibrazione non ha avuto esito positivo, ripetere l'iniezione con un tempo di iniezione maggiore o una tensione di iniezione più alta. A tal fine è necessario eseguire delle modifiche al Run Module per la calibrazione spettrale. Gli stessi campioni possono essere reiniettati fino a tre volte. In caso contrario, è anche possibile utilizzare più standard di matrice per una nuova calibrazione spettrale.

9.3.2 Preparazione dei campioni

Tabella 27 Principio della miscela di denaturazione per la preparazione all'elettroforesi su gel capillare

Componente	Volume per reazione
Hi-Di™ formammide	12,0 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µL

- Preparare 12 µL di miscela dalla Tabella 27 per tutti i campioni
- Aggiungere per ciascun Well 1 µL di prodotto PCR (ev. diluito) o allele purulento alla miscela
- Denaturare i campioni a 95 °C per 3 min in un PCR Cycler, raffreddare i campioni nello strumento a 4 °C
- Posizionare i campioni nel dispositivo per l'analisi secondo le istruzioni del produttore dell'apparecchio

Poiché l'iniezione avviene nello stesso momento in tutti i capillari, sulla piastra del dispositivo multicapillare è necessario pipettare sempre 4 o 16 campioni. Qualora si dovessero misurare meno campioni, le posizioni libere dei campioni devono essere riempite con 12 µL Hi-Di™ formammide.

Al fine di garantire un'assegnazione sicura di alleli sul dispositivo multicapillare, sono richiesti più conduttori allelici, indipendentemente dal numero di campioni.

La temperatura ambiente può influenzare notevolmente la dinamica di marcia dei prodotti PCR nei dispositivi multicapillari e comportare dei doppi picchi (Split Peaks) se la temperatura risulta essere troppo bassa. In determinate circostanze, la temperatura influenza anche la velocità di corsa dei frammenti. Accertarsi di rispettare sempre la temperatura operativa raccomandata dai produttori dei dispositivi. Sono considerate ottimali temperature ambiente stabili di >22 °C.

Possibilità di incrementare le intensità di segnale:

- Riduzione delle quote nel DNA lunghezza standard 550 (BTO) a livelli di picco di ca. 500 unità di fluorescenza relative (RFU)
- Purificazione dei prodotti PCR prima dell'analisi

9.3.3 Configurazione del software Data Collection

Prima della primissima prova, è necessario editare nel modo seguente il modulo Run:

- Cliccare nel **Module Manager** del software Data Collection su **New**, per aprire il **Run Module Editor**.

Run Module 3kV_10s_550bp

Tabella 28 Configurazione del modulo Run nell'analizzatore ABI 3130 Genetic

Parametri	Impostazioni
Oven Temperature [°C]	<i>Default</i>
Poly Fill Volume	<i>Default</i>
Current Stability [µA]	<i>Default</i>
PreRun Voltage [kV]	<i>Default</i>
PreRun Time [s]	<i>Default</i>
Injection Voltage [kV]	3.0
Injection Time [s]*	10
Voltage Number of Steps	<i>Default</i>
Voltage Step Interval	<i>Default</i>
Data Delay Time [s]	<i>Default</i>
Run Voltage [kV]	<i>Default</i>
Run Time [s]**	1560

* Differentemente dall'impostazione standard, il tempo di iniezione può variare tra 1 e 20 s, a seconda del campione. Se si tratta di campioni di confronto con livelli di picco molto elevati, è possibile scegliere un tempo di iniezione più breve, per evitare delle irradiazioni. In piccole quantità di cDNA ossia materiali critici dei pazienti, può essere richiesto un tempo fino a 20 s.

** A seconda delle condizioni di analisi, il tempo di esecuzione dovrebbe essere adattato specificamente per Mentype® **AMLplex^{QS}**, in modo da poter analizzare frammenti fino ad una lunghezza di **550 bp**.

- Cliccare su **Save As**, immettere il nome del modulo nuovo (p. es. 3kV_10s_550bp) e confermare successivamente con **OK**
- Per uscire dal **Run Module Editors**, cliccare su **Close**

Avviare Run

- Inserire la piastra 96-Well preparata nell'Autosampler
- Cliccare nel **Protocol Manager** del software Data Collection all'interno della finestra **Instrument Protocol** su **New**, per aprire il **Protocol Editor**

Instrument-Protocol

Tabella 29 Parametri dell'Instrument Protocol nell'analizzatore ABI 3130 Genetic

Protocol Editor	Impostazioni
Nome	p. es. Run36_POP4_BT5_26min
Tipo	REGULAR
Run Module*	3kV_10s_550bp
Dye Set	Any5Dye

* Per i parametri si veda sopra

- Selezionare **OK**, per uscire dall'editor protocolli

Prima di ogni ciclo di prova è necessario applicare nel modo seguente la piastra da misurare:

- Cliccare nel **Plate Manager** del software Data Collection su **New**, per aprire **New Plate Dialog**

Editor piastre (I)

Tabella 30 Impostazioni dell'editor piastre

New Plate Dialog	Impostazioni
Nome	p. es. Plate_BT5_Date
Application	selezionare l'applicazione GeneMapper
Plate Type	96-Well
Owner Name / Operator Name	...

- Selezionare **OK**. In questo modo si apre automaticamente la nuova tabella nell'editor piastre

Editor piastre (II)

Tabella 31 Denominazione dei campioni nell'editor piastre

Parametri	Impostazioni
Sample Name	Denominazione del campione
Priority	p. es. 100 (Default)
Sample Tipo	Sample or allelic ladder
Size Standard	p. es. SST-BTO_60-550bp
Panel	p. es. AMLplex_Panels_v2
Analysis Method	p. es. AMLplex_HID_3130_200rfu
Snp Set	-
User-defined 1-3	-
Results Group 1	(Selezionare Results Group)
Instrument Protocol 1	Run36_POP4_BT5_26min (impostazione precedentemente descritta)

- Cliccare nella cella superiore della tabella, per selezionare l'intera colonna, aggiungere le informazioni dei campioni di matrice selezionati tramite **Edit** → **Fill Down** e confermare infine con **OK**.
- Cliccare in **Run Schedule** → **Find All**, dopodiché selezionare **Link**, per concatenare la piastra 96-Well con la denominazione della piastra appena creata all'Autosampler (posizione A o B). Avviare successivamente il ciclo
- La qualità dei dati grezzi può essere osservata durante il ciclo per ciascun capillare in **Capillaries Viewer** o **Cap/Array Viewer**. I possibili messaggi di errore (**Error Status**) vengono visualizzati in **Event Log**.
- I dati del ciclo di prova vengono rappresentati una panoramica in **Run History** o **Cap/Array Viewer** del software Data Collection. I dati di ciclo dei campioni vengono depositati nella **Run Folder** del **Results Group** precedentemente selezionato.

9.4 Elettroforesi con l'analizzatore ABI PRISM® 3500/3500xL Genetic

Le istruzioni generali per l'analizzatore, la calibrazione spettrale e l'applicazione del software Applied Biosystems 3500 Series Data Collection Versione 3.0 e del software GeneMapper® ID-X Versione 1.4, possono essere consultate nel rispettivo manuale *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide*.

Il sistema a 8 capillari si chiama AB 3500, il sistema a 24 capillari è chiamato ABI 3500xL.

Per un impiego combinato dei cinque coloranti fluorescenti **6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO** è previsto l'utilizzo del **Filter Set AnyDye** virtuale (lo standard della matrice viene denominato in seguito **BT5**).

Tabella 32 Consumables richiesti nell'analizzatore ABI 3500 Genetic

Materiale	Proprietà
Capillari*	36 cm Capillary Array for 3500/3500xL
Polimero*	POP-4™ Polymer for 3500/3500xL
Tampone	10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA for 3500/3500xL

*Sono possibili altre configurazioni dei dispositivi

9.4.1 Calibrazione spettrale / Calibrazione della matrice

Prima di eseguire l'analisi della lunghezza del frammento, è necessario eseguire innanzitutto una calibrazione spettrale con i frammenti PCR dei rispettivi coloranti fluorescenti

6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO per il rispettivo analizzatore.

In questo modo si crea una matrice, che corregge la sovrapposizione degli spettri di emissione di fluorescenza specifici ai colori.

La calibrazione spettrale è suddivisa nelle fasi seguenti:

- Preparazione dello standard della matrice per la calibrazione spettrale
- Caricamento dello standard nella piastra 96-Well (un campione per capillare)
- Preparazione dello strumento per la reazione del Dye Set BT5
- Eseguire la corsa per la calibrazione spettrale e verificare la matrice

Preparazione dello standard della matrice per la calibrazione spettrale

Tabella 33 Principio dello standard di matrice BT5 multi per la calibrazione spettrale dell'analizzatore ABI 3500 Genetic

Componente	Volume per 4 capillari ABI 3500	Volume per 24 capillari ABI 3500xl
Hi-Di™ formammide	108,0 µL	300,0 µL
Matrix Standard BT5	9,0 µL	25,0 µL
Posizione A1-H1	A1-H1	A1-H1, A2-H2, A3-H3*

* Utilizzando una piastra 384-Well, 10 µl della miscela dovrebbero essere immessi nelle posizioni 1, 3 e 5 delle file A, C, E, G, I, K, M, e O.

- Caricare 12 µl di miscela nella piastra 96-Well (per la posizione specifica, si veda la Tabella 33)
- Denaturare i campioni a 95 °C per 3 min in un PCR Cycler, raffreddare i campioni nello strumento a 4 °C
- Posizionare i campioni nel dispositivo per l'analisi secondo le istruzioni del produttore dell'apparecchio

Preparazione dello strumento

Prima della calibrazione spettrale, è necessario accertarsi che sia avvenuta una **Spatial Calibration**. Quest'operazione è richiesta solo dopo l'incorporazione di un nuovo Capillary Arrays. Il processo è dettagliatamente descritto nella *Applied Biosystems 3500/3500xl Genetic Analyzers User Guide*.

Preparazione del Dye Set BT5

Prima della calibrazione spettrale, è necessario considerare il Dye Set per lo standard di matrice BT5.

1. Selezionare **Analyze** e i **Dye Sets** in **Library** e cliccare successivamente su **Create**.
2. Nominare il Dye Set in **Dye Set Name**, p. es. BT5.
3. Selezionare **Matrix Standard** come **Chemistry** e **AnyDye Template** come Dye Set Template.
4. Disattivare **Purple** nel campo **Arrange Dyes**. Accertarsi che siano attivati tutti gli altri colori.
5. I colori vanno assegnati nel modo seguente in **Calibration Peak Order**: **5 – blue, 4 – green, 3 – yellow, 2 – red e 1 – orange**.
6. Non sono richieste ulteriori modifiche nel campo **Parameters**.
7. Cliccare su **Save**, per confermare le modifiche.

Create New Dye Set

Setup a Dye Set

* Dye Set Name: BT5

* Chemistry: Matrix Standard

* Dye Set Template: AnyDye Template

Arrange Dyes

Dye Selection	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Reduced Selection	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Calibration Peak Order	5	4	3	2	0	1

Parameters

The parameters will be used for instruments configured with 36cm capillary array and polymer POP4

Matrix Condition Number Upper Limit: 20.0

Locate Start Point: * After Scan: 300 * Before Scan: 5000

* Limit Scans To: 20000

Sensitivity: 0.1

* Minimum Quality Score: 0.8

Notes: Matrix Std. BT5 multi cap.

Close Save

Figura 5 Impostazioni per la calibrazione spettrale del Dye Set BT5

Eeguire la calibrazione spettrale

Dopo aver caricato la miscela per la calibrazione spettrale, posizionare la piastra Multi-Well nell'Autosampler e avviare successivamente la calibrazione spettrale.

1. Selezionare **Maintenance** sul Dashboard del software 3500 Series Data Collection, per aprire Spectral Calibration Screen.
2. È necessario definire il numero di cavità della piastra Multi-Well nonché la loro posizione nel dispositivo.
3. Selezionare **Matrix Standard** come Chemistry Standard e **BT5** per il Dye Set (precedentemente creato).
4. Attivare **Allow Borrowing** (opzionale).

5. Cliccare su **Start Run**.

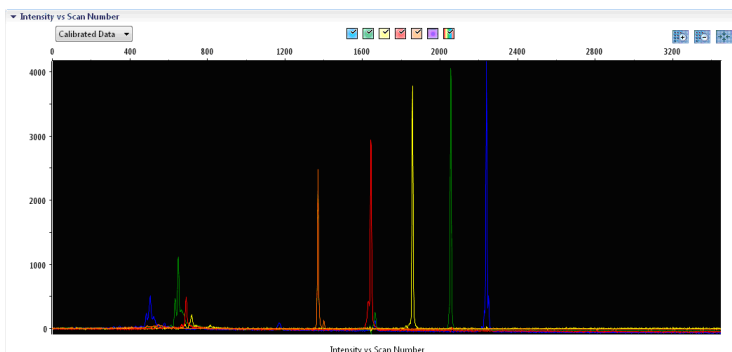


Figura 6 Elettroferogramma della calibrazione spettrale con lo standard di matrice BT5 multi nell'analizzatore ABI 3500 Genetic

Verifica della matrice

- Ogni capillare dovrebbe presentare un valore di qualità (**Q Value**) di oltre 0.8 nonché un coefficiente di condizione (**Condition number range**) compreso fra 1 e 20 ()
- Verificare se è presente una linea di base stabile. Devono essere riconoscibili cinque picchi con livelli di picco compresi fra 1.000 e 5.000 RFU (asse Y) in ogni capillare (campo ottimale: 2.000-4.000 RFU), si veda la Figura 6.
- Una calibrazione riuscita con successo viene indicata in verde per ogni capillare in **Overall**.
- Se sono stati calibrati con successo tutti capillari, cliccare su **Accept Results**
- Se la calibrazione non ha avuto esito positivo, cliccare su **Reject Results**. In questo caso rimandiamo al capitolo "spectral calibration troubleshooting" della *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guides*.

9.4.2 Preparazione dei campioni

Tabella 34 Principio della miscela di denaturazione per ogni reazione in preparazione sull'elettroforesi a gel capillare

Componente	Volume per reazione
Hi-Di™ formammide	12,0 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µL

- Preparare 12 µL di miscela dalla Tabella 34 per tutti i campioni
- Aggiungere alla miscela per ciascun Well 1 µL di prodotto PCR (ev. diluito) o scala allelica
- Denaturare i campioni a 95 °C per 3 min in un PCR Cycler, raffreddare i campioni nello strumento a 4 °C
- Posizionare i campioni nel dispositivo per l'analisi secondo le istruzioni del produttore dell'apparecchio

Poiché l'iniezione avviene nello stesso momento in tutti i capillari, sulla piastra del dispositivo multicapillare è necessario pipettare sempre 8 o 24 campioni. Qualora si dovessero misurare meno campioni, le rispettive posizioni dei campioni devono essere riempite con 12 µL Hi-Di™ formammide.

Al fine di garantire un'assegnazione sicura di alleli sul dispositivo multicapillare, sono richieste più scale alleliche, indipendentemente dal numero di campioni.

La temperatura ambiente può influenzare notevolmente la dinamica di marcia dei prodotti PCR nei dispositivi multicapillari e comportare dei doppi picchi (Split Peaks) se la temperatura risulta essere troppo bassa.

In determinate circostanze, la temperatura influenza anche la velocità di corsa dei frammenti. Accertarsi di rispettare sempre la temperatura operativa raccomandata dai produttori dei dispositivi. Sono considerate ottimali temperature ambiente stabili di >22 °C.

Possibilità di incrementare le intensità di segnale:

- Riduzione delle quote nel DNA lunghezza standard 550 (BTO) a livelli di picco di ca. 500 unità di fluorescenza relative (RFU)
- Purificazione dei prodotti PCR prima dell'analisi

9.4.3 Impostazioni per Run

Per il primo Run con l'applicazione Mentype® **AMLplex^{QS}** è necessario creare dei protocolli specifici all'interno del software 3500 Series Data Collection.

Creazione dell'Instrument Protocol

- Selezionare in **Library l'Analyze / Instrument protocol** e cliccare quindi su **Create**
- Modificare i parametri come descritto nella tabella in basso:

Instrument Protocol per Mentype® AMLplex^{QS}

Tabella 35 Impostazioni dell'Instrument Protocol nell'analizzatore ABI 3500 Genetic

Parametri	Impostazione
Application Type	HID or Fragment
Capillary Length	<i>Default</i>
Polimero	<i>Default</i>
Dye Set	BT5
Run Module	<i>Default</i>
Protocol Name	p. es. Mentype AMLplex ^{QS}
Oven Temperature [°C]	<i>Default</i>
Run Voltage [kV]	<i>Default</i>
Injection Voltage [kV]	3.0
Run Time [s]**	1560**
PreRun Time [s]	<i>Default</i>
Injection Time [s]*	8*
Data Delay Time [s]	<i>Default</i>
Advanced Options	<i>Default</i>

* Differentemente dall'impostazione standard, il tempo di iniezione può variare tra 1 e 20 s, a seconda del campione. Se si tratta di campioni di confronto con livelli di picco molo elevati, è possibile scegliere un tempo di iniezione più breve, per evitare delle irradiazioni. In piccole quantità di cDNA ossia materiali critici dei pazienti, può essere richiesto un tempo fino a 20 s.

** A seconda delle condizioni di analisi, il tempo di esecuzione dovrebbe essere adattato specificamente per Mentype® AMLplex^{QS}, **in modo da poter analizzare frammenti fino ad una lunghezza di 550 bp.**

- Cliccare su **Save**, per confermare le impostazioni.

Impostazioni per lo standard di lunghezza

- Selezionare in **Library l'Analyze / Size Standards** e cliccare successivamente su **Create**
- Modificare i parametri come descritto nella Tabella 36 in basso:

Tabella 36 Impostazione dello standard di grandezza nell'analizzatore ABI 3500 Genetic

Parametri	Impostazione
Size Standard	BTO_550
Dye Color	Orange

La DNA Size Standard 550 (BTO) deve essere applicata con le seguenti lunghezze dei frammenti: **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, and 550 bp.**

- Cliccare su **Save**, per confermare le impostazioni.

Predisposizione del QC o Size Calling Protocol

- Selezionare il **Library** l'**Analyze / QC o Size Calling Protocol** e cliccare successivamente su **Create**
- Modificare i parametri come descritto nella tabella in basso:

Tabella 37 Impostazione del QC risp. Size Calling Protokoll nell'analizzatore ABI 3500 Genetic

Parametri	Impostazione
Protocol Name	Nome
Size Standard	BTO_550 (precedentemente predisposto)
Sizecaller	Size Caller v.1.1.0

- Selezionare **disable Purple** in **Analysis Settings / Peak Amplitude Threshold**. Tutti gli altri colori devono essere attivati.
- Tutte le altre impostazioni rimangono su **Default**.
- Cliccare sui **Save**, per confermare le impostazioni.

Creare un Assays

- Selezionare **Manage / Assays** in **Library** e cliccare successivamente su **Create**
- Modificare i parametri come descritto nella tabella in basso:

Tabella 38 Parametri Assay nell'analizzatore ABI 3500 Genetic

Parametri	Impostazione
Assay Name	p. es. Mentype AMLplex ^{QS}
Color	Default
Application Type	HID o Fragment
Instrument Protocol	p. es. Mentype AMLplex ^{QS}
QC (Size Calling) Protocol	p. es. BTO_550

- Cliccare su **Save**, per confermare le impostazioni.

Avviare il Run

- Inserire la piastra Multi-Well preparata nell'Autosampler
- Cliccare nel Dashboard del software Data Collection su **Create New Plate**
- Selezionare **Plate Details** in **Define Plate Properties**
- Modificare i parametri come descritto nella Tabella 39 in basso:

Dettaglio di piastre

Tabella 39 Dettagli delle piastre nell'analizzatore ABI 3500 Genetic

Parametri	Impostazione
Nome	p. es. Mentype AMLplex ^{QS}
Number of Wells	96 or 384
Plate Type*	HID o Fragment
Capillary Length	36 cm
Polimero	POP4

- Cliccare su **Assign Plate Contents**, per confermare le impostazioni
- Definire la posizione di ciascuna cavità occupata da un campione del paziente o allelico per la raccolta e la valutazione dei dati
- Assegnare ad ogni cavità denominata un **Assay** (necessario), **File Name Conventions** e **Result Group**
- Cliccare su **Link the plate for Run** e immettere il nome del Run.
- Cliccare su **Start Run**

10. Valutazione dei dati

10.1 Software e modelli di valutazione

La valutazione dei dati avviene con il software GeneMapper™ ID o GeneMapper™ ID-X (Applied Biosystems™).

Per una facile valutazione dei dati, la ditta Biotype GmbH offre impostazioni preconfigurate al sito www.biotype.de (Tabella 40), che possono essere importate nella rispettiva versione GeneMapper™ e che rimpiazza la creazione manuale dei parametri di analisi.

Nota: L'importazione e l'assegnazione di allele con l'ausilio dei modelli di valutazione offerti può essere garantita solo per il software GeneMapper™ ID/ID-X. Nell'utilizzo di GeneMapper™ possono verificarsi dei problemi all'importazione di propri modelli di valutazione.

Nota: I modelli disponibili per Bins e Panel Set definiscono la lunghezza dei singoli frammenti. A causa di lievi differenze di performance dei diversi dispositivi di elettroforesi su gel capillare possono verificarsi delle lievi deviazioni. Biotyping GmbH può anche personalizzare i Bins e Panels, non esitate a contattarci a tal fine all'indirizzo support@biotype.de.

Tabella 40 Panoramica dei modelli disponibili per l'importazione in GeneMapper™ ID/ID-X

Modello	Nome	
Panels	AMLplex_Panels_v2/v2x	0 versione maggiore
BinSets	AMLplex_Bins_v2/v2x	0 versione maggiore
Size Standard	SST-BTO_60-550bp	
Analysis Method	AMLplex_HID_310_200RFU	Consigliato
	AMLplex_HID_3130_200RFU	Consigliato
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Setting	Table for 10 Alleles	
	Table for 22 Alleles	

Qualora si dovesse creare manualmente il modello di analisi, sarà necessario selezionare i parametri seguenti (Tabella 41):

Tabella 41 Parametri per la creazione manuale di un metodo di analisi in GeneMapper™ ID/ID-X

Parametri	Impostazione
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

* Se necessario, è anche possibile ridurre la Peak Window Size a 11 pts.

10.2 Procedura per la valutazione dei dati

10.2.1 Requisiti minimi generali per la valutazione dei dati

I file fsa di elettroforesi su gel capillare sono valutati qualitativamente, vale a dire, sono controllati per accertare la presenza di picchi di amplificazione. In questo caso, un piccolo deve raggiungere almeno un livello pari 200 RFU ed essere al contempo almeno 3 volte più grande del rumore di fondo della linea di base. Questi criteri si applicano sia ai picchi di controllo (controllo QS e ABL) che ai picchi per le fusioni dei geni.

L'unica eccezione è rappresentata dal Size Standard 550 (BTO), qui è raggiungibile un livello di picco minimo di 50 RFU.

10.2.2 Controllo dello standard di lunghezza Size Standard 550 (BTO)

Il rilevamento delle lunghezze esatte dei frammenti dei prodotti amplificati dipende sostanzialmente dal DNA utilizzato per lo standard di lunghezza. A causa della complessità di alcuni Loci, per determinare la lunghezza dovrebbero essere utilizzati numerosi punti di riferimento distribuiti in maniera uniforme. A tal fine è da utilizzare il DNA dello standard di lunghezza Size Standard 550 (BTO, Figura 7) con lunghezza di frammenti di 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 e 550 bp.

Accertarsi nell'elettroferogramma (canale arancione) di tutti i campioni che siano presenti tutti gli alleli dello standard di grandezza, un sufficiente livello di picco di almeno 50 RFU e che siano stati assegnati correttamente (si veda Figura 7).

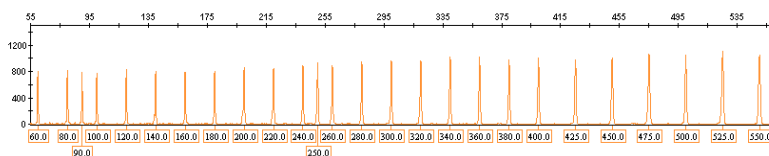


Figura 7 Elettroferogramma della Size Standard 550 (BTO), analizzato su ABI 3500, software GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, asse y: 55-560 bp, asse x: 0-1500 RFU

Nota: Qualora nei vari campioni non dovessero essere analizzati tutti i frammenti dello standard di grandezza, può risultare una insufficiente valutazione della scala allelica e dei campioni. Pertanto, accertarsi sempre che lo standard di grandezza sia stato analizzato con successo.

10.2.3 Controllo della scala allelica/Alelic Ladder

La scala allelica contiene tutti i frammenti rilevabili con Mentype® **AMLplex^{QS}** (si veda Tabella 1 nonché Figura 8). Questi frammenti devono perciò essere presenti nella scala allelica e rilevabili con un livello di almeno 200 RFU. I geni di fusione e le varianti di trascrizione associate si trovano sempre in un canale di colori (Tabella 42).

Tabella 42 Panoramica della distribuzione delle fusioni geniche sui canali di colore

Canale color blu	Canale color verde	Canale color giallo
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 e controllo ABL		

Nota: Se nell'utilizzo dei modelli di valutazione (fra l'altro, Bins e Panels Set) non dovessero essere automaticamente nominati tutti i frammenti della scala allelica, vogliate rivolgervi al supporto all'indirizzo support@biotype.de, poiché potrebbe essere necessario un adattamento del modello alle impostazioni. In tal caso è possibile procedere con l'assegnazione mancante dei picchi nei campioni.

10.2.4 Verifica del controllo cDNA KAS-1

Il kit Mentype® AMLplexQS contiene la verifica del controllo positivo cDNA KAS-1 *, che risulta positivo per la fusione genica RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO).

Accertarsi che i picchi di controllo QS-Control e ABL-Control appaiono con un livello sufficiente. Accertarsi che il picco per la traslocazione RUNX1-RUNX1T1 appaia con un livello sufficiente nell'elettroferogramma (Figura 9). Accertarsi che non appaiano alcuni prodotti secondari inaspettati nell'elettroferogramma.

*La coltura cellulare per la creazione del cDNA è stata acquisita da: DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany. L'utilizzo di questo cDNA è stabilito esclusivamente per Mentype® AMLplex^{QS}.

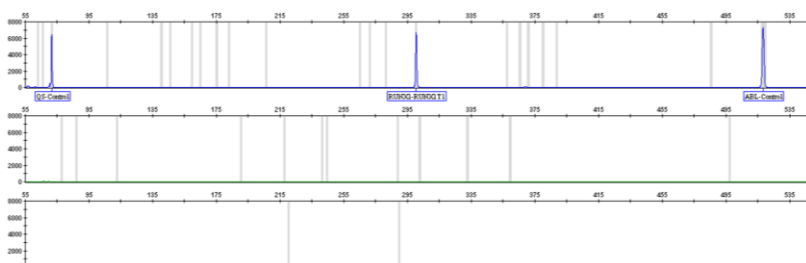


Figura 9 Elettroferogramma del Control cDNA KAS-1, analizzato su ABI 3500, GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, asse y 55-550 bp, asse x 0-8.000 RFU

10.2.5 Verifica del controllo negativo

Verificare che non appaiano alcuni picchi specifici della traslocazione superiori a 200 RFU nell'elettroferogramma (canale blu, verde, giallo).

No-Template Control: Accertarsi che appaia solo il picco di controllo QS-Control con un livello sufficiente, ma non il picco di controllo ABL (Figura 10).

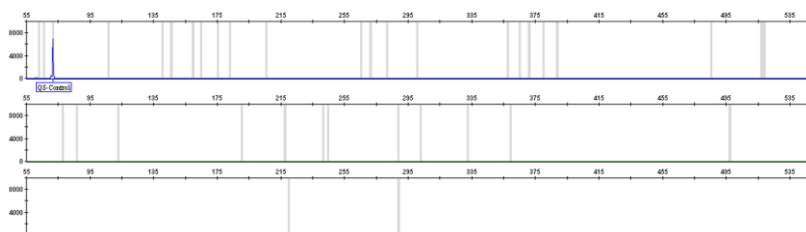


Figura 10 Elettroferogramma di un Non Template Control, analizzato su ABI 3500, GeneMapper ID-X 1.4, Template Files v3x, asse y 0-10.000 RFU, asse x 55-550 bp

Campione di controllo negativo: Accertarsi che in un cDNA conosciuto, risultante negativo per le fusioni di geni rilevabili e le transazioni, i picchi di controllo QS-Control e ABL-Control appaiano con un livello sufficiente (Figura 11).

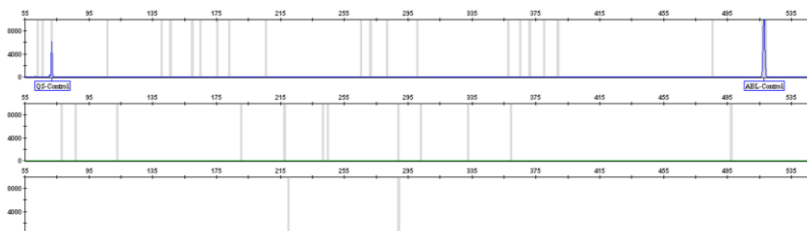


Figura 11 Elettroferogramma di un campione di controllo negativo, analizzato su ABI 3500, GeneMapperTM ID-X 1.4, Template Files v3x, asse y 0-10.000 RFU, asse x 55-515 bp

10.2.6 Valutazione dei dati dei campioni

Dopo aver verificato gli standard di grandezza, le scale alleliche e i campioni di controllo, avviene la valutazione dei dati dei campioni.

Nota: Il Mentype® **AMLplex^{QS}** è un mero test qualitativo. Una valutazione quantitativa, ad esempio, nell'ambito di una determinazione della MRD non è espressamente possibile.

Utilizzando i modelli di valutazione di Biotype GmbH e una valutazione di successo della scala allelica della corsa, vengono nominati automaticamente i frammenti PCR rilevati. Nella Tabella 43 si trova una panoramica sulle lunghezze dei frammenti dei prodotti PCR.

Nota: Mentype® **AMLplex^{QS}** è stato convalidato su POP-4™ e certificato. L'utilizzo di un altro polimero (p. es. POP-7™ o POP-6™) può alterare il comportamento di corsa dei prodotti specifici PCR. In determinate circostanze può essere necessario un adattamento del Biotype® Template (Panels e BinSet). Vogliate rivolgervi al nostro supporto tecnico (support@biotype.de). Inoltre, è stato osservato un aumento del rumore di fondo maggiore in seguito ad un comportamento alterato dei residui di colorante fluorescente libero.

Tabella 43 Panoramica sulle lunghezze dei frammenti delle singole traslocazioni nella scala allelica di Mentype® AMLplex^{QS}, rilevate con l'utilizzo di POP-4TM; † per la variante KMT2A-MLLT3_6A sono attesi due ampliconi; * A causa della lunghezza variabile dell'amplicone di PML-RARA_bcr2 (ca. 173 bp) la variante non può essere assegnata automaticamente, ma è rilevabile con i primer di Mentype® AMLplex^{QS}

Pannello/traslocazione	Dimensione [bp]	Pannello/traslocazione	Dimensione [bp]
Canale blu		Canale verde	
CBFB-MYH11_TipoG	63	DEK-NUP214	78
CBFB-MYH11_TipoI	66	KMT2A-PTD_e9e3	87
QS-Control	72	KMT2A-MLLT3_6A_S [†]	113
BCR-ABL_b2a3	107	KMT2A-MLLT3_6B	191
CBFB-MYH11_TipoJ	141	KMT2A-PTD_e10e3	218
CBFB-MYH11_TipoC	146	KMT2A-ELL_e10e3	242
CBFB-MYH11_TipoD	160	KMT2A-MLLT3_7A	245
CBFB_MYH11_TipoH	165	KMT2A-ELL_e10e2	289
CBFB_MYH11_TipoF	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_TipoA	271	Canale giallo	
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_TipoE	365		
MLLT10_240-PICALM_1987	371		
BCR-ABL_e1a2	380		
NPM1-MLF1	389		
CBFB-MYH11_TipoB	486		
ABL-Control	518		

11. Troubleshooting

La valutazione post-PCR precedentemente descritta con l'assegnazione automatica dell'allele garantisce una differenziazione precisa e affidabile dei trascritti dei geni di fusione e delle loro varianti. Si prega di verificare l'assegnazione corretta degli alleli nella scala allelica in ciascuna corsa.

11.1 Limite di rilevamento

Nell'ambito degli esperimenti con plasmidi, con un numero di cicli pari a 25 è stato determinato un limite di rilevamento di ≤ 1.000 copie per 32 varianti su 34 trascrizioni. Le varianti di trascrizione CBF-B-MYH11_Type C e KMT2A-MLLT4 (MLL-AF6) presentano tuttavia delle deviazioni. Con un numero di cicli pari a 28, è possibile determinare 1.000 copie di CBF-B-MYH11_Type C e 10.000 copie di KMT2A-MLLT4 (MLL-AF6). Se sono disponibili i numeri di copie specificati, il livello di picco raggiungibile risulterà >200 RFU.

In questa applicazione si tratta di uno strumento di screening basato sulla metodica PCR convalidata e certificata per sottotipi di classificazione AML. Questa applicazione non è adatta per la quantificazione o il monitoraggio della malattia dei minimi residui (MRD).

11.2 Irradiazioni (Pull-up Peaks)

Potrebbero verificarsi delle irradiazioni tra i pannelli colorati se per l'analisi è stata utilizzata una matrice inappropriata i livelli di picco del prodotto PCR si trovano al di fuori del campo di rilevamento lineare dello strumento. Questi appaiono nella stessa posizione dei picchi specifici in altri pannelli colorati (di solito con intensità di segnale inferiori).

Nota: Se necessario, diluire i prodotti PCR prima dell'elettroforesi su gel capillare, per ottenere dei risultati chiaramente valutabili. In caso di irradiazioni, nonostante vi fossero delle zone di fluorescenza ottimali, si dovrebbe cambiare la matrice.

11.3 Attacco di nucleotidi indipendente dal modello

La polimerasi multi-Taq DNA, a causa della sua attività di transferasi terminale, lega preferibilmente l'adenosina all'estremità 3 del frammento di DNA amplificato. Se il sistema PCR non ha tempo sufficiente per l'estensione o se le sequenze di primer non favoriscono l'estensione, questo attacco non si verificherà. Questo artefatto è riconoscibile dall'aspetto di un frammento troncato a una base (-1 bp Peak). Tutti i primer Biotype® sono progettati per minimizzare questa formazione di artefatti. Inoltre, la formazione dell'artefatto viene ridotta tramite la fase di estensione finale nel prodotto PCR (68 °C per 10 min). Il livello di picco dell'artefatto aumenta con livelli elevati di cDNA. Per valutare i picchi, ogni laboratorio analitico dovrebbe stabilire i propri limiti.

11.4 Artefatti

La temperatura ambiente può influenzare notevolmente la dinamica di marcia dei prodotti PCR nei dispositivi capillari e comportare degli spallamenti o dei doppi picchi (Split Peaks) se la temperatura risulta essere troppo bassa. Inoltre, può essere pregiudicata l'assegnazione automatica di alleli. Qualora si dovessero osservare questi effetti, consigliamo

di reiniettare i campioni possibilmente con più scale alleliche per ciclo. Accertarsi di rispettare sempre la temperatura operativa raccomandata dai produttori dei dispositivi. Sono considerate ottimali temperature ambiente stabili di >22 °C.

11.5 Influsso del tipo di polimero

Mentype® **AMLplex^{QS}** è stato convalidato su POP-4™ e certificato. L'utilizzo di un altro polimero (p. es. POP-7™ o POP-6™) può alterare il comportamento di corsa dei prodotti specifici PCR. In determinate circostanze può essere necessario un adattamento del Biotype® Template (Panels e BinSet). Vogliate rivolgervi al nostro supporto tecnico (support@biotype.de). Inoltre, è stato osservato un aumento del rumore di fondo maggiore in seguito ad un comportamento alterato dei residui di colorante fluorescente libero.

12. Informazioni per le ordinazioni

Tabella 44 Informazioni d'ordine dettagliate dei kit Mentype® **AMLplex**^{QS}

Kit	Grandezza della confezione	Numero d'ordine
Mentype® AMLplex ^{QS}	10 reazioni	45-31220-0010
Mentype® AMLplex ^{QS}	25 reazioni	45-31220-0025
Mentype® AMLplex ^{QS}	100 reazioni	45-31220-0100
Mentype® AMLplex ^{QS}	400 reazioni	45-31220-0400

13. Referenze

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. Marchi ed esclusione di responsabilità

I nomi registrati, marchi depositati, ecc., utilizzati in questo documento, anche se non espressamente contrassegnati come tali, non devono essere considerati come non tutelati: 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.).

I kit Mentype[®] **AMLplex^{QS}** sono identificati dal marchio CE conformemente alla direttiva europea 98/79/CE per i diagnostici in vitro. I kit non sono disponibili come diagnostici in vitro al di fuori di questo campo di regolamentazione.

15. Simboli



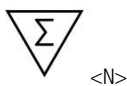
Produttore



Data di produzione



Denominazione del lotto



Sufficiente per <N> test



Osservare le istruzioni (manuale) per l'uso



Utilizzabile fino al



Limite di temperatura



Numero d'ordine



Diagnostici in vitro

Verifica e convalida dei kit di amplificazione Mentype® AMLplex^{QS} PCR

A Convalida analitica

A a) Determinazione della reazione standard e tolleranze specifiche al lotto

Obiettivo: Determinazione della reazione standard e delle tolleranze specifiche al lotto rispetto ai livelli di segnale assoluti (RFU), al bilanciamento dei livelli di segnale del multiplex PCR e alla linea di base. Inoltre, le impostazioni del dispositivo specifiche del test per la genotipizzazione mediante elettroforesi su gel capillare (Bins e Panels) sono determinate sulla base dei risultati utilizzando i modelli di valutazione del sequenziatore del DNA.

Metodica: Il kit di test contiene il cDNA di controllo della linea cellulare KASUMI-1 (ACC220, Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig), che contiene la fusione genica AML1-ETO con l'aberrazione cromosomica t (8; 21) (q22; q22) [7]. Inoltre, è stata utilizzata una miscela di modelli equimolari artificiali di plasmidi contenenti 33 delle 34 varianti rilevabili. La reazione standard è stata condotta con il cDNA di controllo nella concentrazione nominale di 250 ng per PCR e 25 cicli PCR. La miscela del modello è stata regolata in modo tale che dopo 25 cicli di PCR sono stati raggiunti i livelli di segnale nel campo di misura lineare dei dispositivi di analisi utilizzati (max RFU). È stata effettuata una determinazione quadrupla altrettanto con quattro valori ciechi (no template control, NTC) senza DNA.

Risultati: Per la miscelazione specifica per lotto di primer PCR, sono state definite le seguenti specifiche: Utilizzando un analizzatore ABIS PRISM® 310 Genetic sono stati ottenuti livelli di segnale di 1.000-4.000 RFU e, utilizzando l'analizzatore ABI PRISM® 3130 Genetic, livelli di segnale di 1.000-5.000 RFU in combinazione con la miscela modello. I segnali specifici rilevati partono da un livello di segnale di 200 RFU. Nel campo di ridimensionamento non sono stati rilevati segnali aspecifici (tinture libere, artefatti) di > 200 RFU (linea di base).

A b) Test della precisione di misurazione

Obiettivo: Informazioni sulla correttezza del processo di misurazione e un riepilogo sufficientemente dettagliato dei dati che consentiranno di valutare l'adeguatezza dei mezzi per verificare la correttezza. Le misurazioni della correttezza possono essere utilizzate solo per test quantitativi e qualitativi se è disponibile uno standard o un metodo di riferimento.

Metodica: Il kit è convalidato dalla regolare partecipazione ai test di competenza e controllato per la corretta dichiarazione qualitativa (diagnosi). Dal 03.06.2013, Biotype partecipa regolarmente ai ring trial del sistema nazionale di valutazione della qualità degli United Kindom National Quality Assessment Schemes (UKNEQAS, www.ukneqas.org.uk) per il rilevamento di traslocazioni BCR-ABL e AML. Questi si svolgono regolarmente (2x) all'anno e sono valutati dalle autorità. I risultati (stato delle prestazioni) anche rispetto agli altri partecipanti, saranno inviati dopo la partecipazione.

Risultati: Lo stato di performance attuale è „Green“. Il prodotto ha dimostrato di essere adatto per il rilevamento di varianti BCR-ABL e traslocazioni AML e ottiene i risultati corretti (qualitativi) rispetto ad altri metodi di genetica molecolare.

A c) Test della specificità analitica

A c) a) Test della specificità analitica tramite cDNAs negativamente pre-tipizzati

Obiettivo: Gli studi sono serviti ad escludere risultati falsi positivi a causa di interferenze e reattività crociate con cDNA selezionati da campioni negativamente pre-tipizzati (pazienti e donatori sani).

Metodica: Sono stati testati 22 cDNA, a loro volta negativamente pre-tipizzati per le varianti di traslocazione da rilevare nel kit di test. Le quantità utilizzate dovrebbero coprire il campo di concentrazione previsto nella pratica clinica e ammontano a 145 ng fino a max. 934 ng cDNA per principio PCR con 25 cicli.

Risultati: Nel campo di allele definito dai Bins e Panels (Templates) non è stata rilevata alcuna reattività crociata (>200 RFU). Il segnale di misurazione per il controllo interno del cDNA (ABL-Gen) corrispondeva a >200 RFU con 21 cDNAs, in un caso singolo a ca. 50 RFU. Il valore limite per l'assegnazione automatica degli alleli è stato settato a 200 RFU.

A c) b) Test della specificità analitica tramite cDNA positivamente pre-tipizzato

Obiettivo: Le analisi si prefiggevano l'obiettivo di escludere risultati falsi positivi a causa di interferenze e reattività crociate con cDNAs selezionati primariamente da campioni negativamente pre-tipizzati (pazienti e donatori sani).

Metodica: Sono stati testati 20 cDNA, a loro volta positivamente pre-tipizzati per le varianti di traslocazione da rilevare nel kit di test. La quantità utilizzata corrispondeva a 250 ng cDNA per principio PCR. Il programma PCR è stato eseguito con 25 cicli.

Risultati: È stato possibile rilevare chiaramente tutte le mutazioni somatiche predeterminate. Nel campo di allele definito non è stata rilevata alcuna reattività crociata (>50 RFU). I segnali di misurazione per le mutazioni somatiche e il controllo interno del cDNA (ABL-Gen) corrispondevano a >200 RFU con 16/20 campioni e a >50 RFU con 3/20 campioni. Un campione ha raggiunto solo valori inferiori a 50 RFU, tuttavia, la variante del gene di fusione era ancora rilevabile. Il valore limite per l'assegnazione automatica degli alleli è stato settato a 200 RFU.

A d) Test della sensibilità analitica

Obiettivo: Le analisi avevano l'obiettivo di determinare il limite di rilevabilità analitica del test (sensibilità).

Metodica: È stata testata una serie di diluizioni con 1 µg fino 31,25 ng di cDNA di riferimento (Kasumi-1) in determinazione quadruplicata. Il programma PCR è stato eseguito con 25 cicli. Inoltre, le serie di diluizioni di un modello di riferimento preparato artificialmente (Plasmide, GeneArt, Life Technologies) con un numero di copie definito sono state testate per ciascuna variante di trascrizione da rilevare in determinazione doppia.

Risultati: Fino a una concentrazione di cDNA di 62,5 è stato possibile rilevare intensità di segnale $ng > 200$ per la traslocazione specifica e per il controllo ABL RFU. Con 31,25 ng l'intensità di segnale della variante specifica corrispondevano a >200 RFU, mentre quelle nel controllo ABL a >50 RFU. I valori ottimali in riferimento al campo di misura del sequenziatore capillare si trovavano in un campo compreso fra 150 ng-250 ng. Le misurazioni delle diluizioni plasmidiche hanno mostrato che per tutte le varianti di traslocazione è possibile raggiungere un limite di rilevamento di > 200 RFU in 100-1000 copie.

A e) Test di vari PCR-Thermal Cyclers

Obiettivo: I PCR-Thermal Cyclers di diversi produttori si distinguono dalle loro specifiche. In particolare, possono essere presenti diverse velocità di riscaldamento raffreddamento e diverse tecniche di regolazione della temperatura.

Metodica: I test delle reazioni standard con DNA di controllo nella concentrazione nominale di 250 ng sono stati eseguiti con i seguenti Thermal Cyclers in determinazione quadrupla con la stessa Mastermix e 2 campioni ciechi senza DNA: Thermal Cyclers Eppendorf Mastercycler ep-S (Eppendorf AG, Hamburg), Applied Biosystems® GeneAmp 9700 con blocco argenteo (Life Technology GmbH, Darmstadt), Applied Biosystems® GeneAmp 9700 con blocco alluminico (Life Technology GmbH, Darmstadt).

Risultati: A tutti i Thermal Cyclers è stato possibile assegnare correttamente tutte le amplificazioni. Tutti i frammenti della miscela del modello sono stati amplificati con successo.

A f) Test dell'influsso delle diverse temperature di Annealing nel PCR

Obiettivo: Per determinare la robustezza dei PCR, le oscillazioni di temperatura sono simulate per la fase di attacco primario (Annealing) del Multiplex-PCR. In questa fase di temperatura è critica per la sensibilità e la specificità dei PCRs.

Metodica: La temperatura di Annealing specifica al kit di 60 °C della reazione standard con DNA di controllo nella concentrazione nominale di 250 ng è stata variata di ± 1 °C e ± 2 °C. È stata effettuata una determinazione tripla con il medesimo Mastermix.

Risultati: In caso di oscillazioni del dispositivo di ± 1 °C rispetto alla temperatura di Annealing indicata, il kit risulta essere stabile. Le altezze di segnale ottimali di tutti i sistemi vengono raggiunte con una temperatura di Annealing di 61 °C.

A g) Test dei diversi batches di Buffer di PCR

Obiettivo: I rapporti di concentrazione dei principi attivi del tampone PCR come miscela di reazione A (dNTPs, concentrazioni di ioni, in particolare Mg^{2+}) sono fondamentali per la sensibilità, specificità e l'equilibrio dei segnali nel Multiplex-PCR. Pertanto, la robustezza del test viene testata contro le oscillazioni di carico del tampone PCR fornito.

Metodica: Il test di 3 lotti REM-A indipendenti è stato effettuato nella reazione standard con DNA di controllo nella concentrazione nominale di 250, nonché della scala allelica e una linea di cDNA con espressione debole (MLL-AF6).

Risultati: Ogni nuovo lotto creato REM A viene testato con il kit identificazione Mentype® **AMLplex^{QS}**. Un'abilitazione del lotto REM A avviene solamente a condizione che i risultati ottenuti con il Mentype® **AMLplex^{QS}** siano contenuti all'interno della specifica.

A h) Inalterabilità dopo l'apertura

Obiettivo: La stabilità dei reagenti del kit PCR-Kit è stata testata in seguito a ripetuti congelamenti e scongelamenti.

Metodica: I reagenti del kit sono stati sottoposti 20 volte a un ciclo di congelamento e scongelamento. Il congelamento è stato effettuato per almeno 1 h ad una temperatura di -20 °C. Lo scongelamento è avvenuto a temperatura ambiente e i reagenti sono stati omogeneizzati tramite agitazione prima dell'uso. Successivamente è stata effettuata una reazione standard con DNA di controllo nella concentrazione nominale di 250 ng e valori ciechi supplementari senza DNA in determinazioni triple. La valutazione è stata effettuata rispetto ad una reazione standard senza ciclo di congelamento e scongelamento.

Risultati: La deviazione dei livelli di picco rilevati a confronto con la reazione standard corrispondeva al massimo a 20 % (in particolare perdita di segnale). Nei valori ciechi non sono stati rilevati alcuni livelli di picco aggiuntivi di >50 RFU all'interno del campo di scala.

B Dati di rendimento clinici**B a) Prelevamento campioni, aspetti etici e regolatori**

È stato effettuato un test di valutazione delle prestazioni ai sensi dei §§ 20 fino al 24 della legge sui prodotti medicali (DE). L'esenzione dall'obbligo di autorizzazione per i dispositivi medicali con un basso rischio di sicurezza secondo § 7 dell'ordinanza sulle sperimentazioni cliniche dei dispositivi medicali è stata rilasciata dall'Istituto Federale per farmaci e dispositivi medicali. Erano disponibili un voto di approvazione del comitato etico responsabile e le rispettive dichiarazioni di consenso del paziente.

È stato utilizzato sangue venoso intero di 297 pazienti e 10 probanti sani.

B b) Test comparativo

L'obiettivo primario consta nel rilevamento di sensibili diagnostiche e specificità a confronto con i metodi di riferimento. Per una selezione delle traslocazioni erano disponibili metodi citogenetici standardizzati (cariotipo, analisi FISH) [8]. Per le traslocazioni che non potevano essere citogeneticamente visualizzate, sono stati utilizzati Monoplex-nested-PCR convalidati e approvati [9, 10].

B c) Estrazione e purificazione del DNA

Sono state ottenute da sangue intero eparinizzato cellule mononucleate per mezzo di una centrifugazione a gradiente di densità (MNC). Successivamente, l'mRNA totale è stato ottenuto utilizzando kit di estrazione di mRNA disponibili in commercio (RNeasy Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, DE). Questo è stato convertito in cDNA utilizzando kit disponibili in commercio (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen GmbH, Hilden, DE). La qualità del cDNA è stata testata mediante PCR in tempo reale (test interno validato). I singoli geni o mutazioni di fusione sono stati controllati con singole PCR validate.

B d) Risultati

Il kit di amplificazione Mentype® **AMLplex^{QS}** PCR non ha mostrato alcune mutazioni con il cDNA dei 10 probanti sani. Nell'ambito degli ulteriori calcoli dei risultati non sono stati considerati i risultati ottenuti. Successivamente sono stati analizzati 297 campioni dei pazienti. Di questi, non è stato possibile valutare 5 campioni (segnale di controllo per ABL al di sotto della soglia raccomandata). Dei restanti 292 campioni, 199 sono risultati negativi rispetto al cariotipo, alla FISH e / o alla PCR di controllo. Dei campioni veramente negativi, 56 hanno mostrato cambiamenti genetici del cariogramma (anomalie cromosomiche) che non possono essere rilevati dal kit. Questo può essere spiegato dal fatto che il kit di amplificazione Mentype® **AMLplex^{QS}** PCR contiene sì le più frequenti traslocazioni, tuttavia, copre solo ca. il 37 % delle anomalie genetiche comunemente osservate nell'AML [8]. I risultati singoli dei test di confronto sono riepilogati nella tabella 5.

Complessivamente è stato possibile raggiungere una sensibilità diagnostica del 94 % e una specificità diagnostica di 99,5 %. Tutti i risultati citogenetici verificati mediante PCR di controllo [9, 10] sono stati chiaramente confermati.

Tabella 5: Compilazione dei risultati dell'esame di valutazione delle prestazioni.

Gen-fusion	Biomarcatori		Prevalenza [%] *	Corretto Positivo	Evaluation of Clinical Performance Testing (n=292)			Sensibilità diagnostica [%]	Specificità diagnostica [%]
	Aberrazione cromosomica	Variante			Corretto Negativo	Errato Positivo	Errato Negativo		
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) Letteratura sui biomarcatori e le loro sequenze DNA

Relazioni generali e citazioni delle banche dati DNA:

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

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

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

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

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

Letteratura scelta per 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, Pisegna 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. Rowley PubMed PMID: 9234595.*

Nucifora G, 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.

Letteratura scelta per BCR-ABL, t(9;22)(q34;q11):

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

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

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

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

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

Letteratura scelta per 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, Selleri 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.

Letteratura scelta per 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

Letteratura scelta per 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

Letteratura scelta per 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.

Letteratura scelta per 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, Schwarzingler 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.

Letteratura scelta per 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.

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

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

Whitman SP, Ruppert AS, Marcucci G, Mrózek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Vukosavljevic T, Powell BL, Carroll AJ, Koltitz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Bloomfield CD. Long-term disease-free survivors with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and MLL partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood.* 2007 Jun 15;109(12):5164-7. Epub 2007 Mar 6. PubMed PMID: 17341662; PubMed Central PMCID: PMC1890839.

Letteratura scelta per 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.

Letteratura scelta per 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.

Altre referenze

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

Tel. +49 351 8838 400

Fax +49 351 8838 403

info@biotype.de

www.biotype.de