



Mentype[®] AMLplex^{QS}

PCR Amplification Kit

Istruzioni per l'uso

**Rilevamento di aberrazioni cromosomiche nella
Leucemia mieloide acuta**

Diagnostici in vitro



AMLIFU01v3it
Luglio 2021



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



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
D-01109 DRESDEN
GERMANY

Made in Germany

AMLIFU01v3it

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	8
5. Materiali forniti in dotazione	9
5.1 Contenuto del kit	9
5.2 Informazioni per le ordinazioni	9
5.3 Altri reagenti e attrezzature richieste (non in dotazione nel kit)	10
6. Stoccaggio	11
7. Ciclo di lavorazione Mentype® AMLplex^{QS}	12
7.1 Preparazione dei campioni e volume applicativo cDNA	12
7.1.1 Isolamento dell'RNA	12
7.1.2 Trascrizione dell'RNA in cDNA	12
7.1.3 Impiego del Template cDNA	12
7.2 Preparazione del Mastermix	13
7.2.1 Controllo positivo	13
7.2.2 Controllo negativo	14
7.3 Volume di reazione	15
8. Programma PCR e amplificazione	16
9. Elettroforesi su gel capillare	17
9.1 Elettroforesi nell'ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer	18
9.1.1 Creazione della matrice	18
9.1.2 Preparazione dei campioni	18
9.1.3 Configurazione del software Data Collection	18
9.2 Elettroforesi nell'analizzatore ABI PRISM® 3100-Avant/3100 Genetic	18
9.2.1 Calibrazione spettrale / Calibrazione della matrice	18
9.2.2 Preparazione dei campioni	18
9.2.3 Configurazione del software Data Collection	18
9.3 Elettroforesi nell'analizzatore ABI PRISM® 3130/3130xl Genetic Analyzer	18
9.3.1 Calibrazione spettrale / Calibrazione della matrice	18
9.3.2 Preparazione dei campioni	18
9.3.3 Configurazione del software Data Collection	18
9.4 Elettroforesi con l'analizzatore ABI PRISM® 3500/3500xL Genetic	18
9.4.1 Calibrazione spettrale / Calibrazione della matrice	18
9.4.2 Preparazione dei campioni	18
9.4.3 Impostazioni per Run	18
10. Valutazione dei dati	19

10.1 Software e modelli di valutazione	19
10.2 Procedura per la valutazione dei dati	20
10.2.1 Requisiti minimi generali per la valutazione dei dati	20
10.2.2 Controllo dello standard di lunghezza Size Standard 550 (BTO)	21
10.2.3 Controllo della scala allelica/Allelic Ladder	21
10.2.4 Verifica del controllo cDNA Kasumi 1	24
10.2.5 Verifica del controllo negativo	24
10.2.6 Valutazione dei dati dei campioni	25
11. Troubleshooting	27
11.1 Limite di rilevamento	27
11.2 Irradiazioni (Pull-up Peaks)	27
11.3 Attacco di nucleotidi indipendente dal modello	27
11.4 Artefatti	27
11.5 Influsso del tipo di polimero	28
12. Informazioni per le ordinazioni	29
13. Referenze	30
14. Marchi ed esclusione di responsabilità	31
15. Simboli	32
Verifica e convalida dei kit di amplificazione Mentype® AMLplex^{QS} PCR	33
A Convalida analitica	33
A a) Determinazione della reazione standard e tolleranze specifiche al lotto	33
A b) Test della precisione di misurazione	33
A c) Test della specificità analitica	34
A c) a) Test della specificità analitica tramite cDNAs negativamente pre-tipizzati	34
A c) b) Test della specificità analitica tramite cDNA positivamente pre-tipizzato	34
A d) Test della sensibilità analitica	34
A e) Test di vari PCR-Thermal Cyclers	35
A f) Test dell'influsso delle diverse temperature di Annealing nel PCR	35
A g) Test dei diversi batches di Buffer di PCR	36
A h) Inalterabilità dopo l'apertura	36
B Dati di rendimento clinici	37
B a) Prelevamento campioni, aspetti etici e regolatori	37
B b) Test comparativo	37
B c) Estrazione e purificazione del DNA	37
B d) Risultati	37
B e) Letteratura sui biomarcatori e le loro sequenze DNA	39

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

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.

A lotto LEUK01095 (Reaction Mix A lotto CH2001597)

La seguente sostanza potenzialmente pericolosa è inclusa in questo kit:

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

Componente del kit	Sostanze chimiche	Pericolo
Reaction Mix A	Azoturo di sodio NaN ₃	Nocivo in caso di ingestione, sviluppa gas nocivi nel contatto con acidi

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 25, 100 o 400 reazioni.

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

Didascalia	Contenuto	Volume per grandezza della confezione		
		25 reaz.	100 reaz.	400 reaz.
Nuclease-Free Water	Acqua priva di nucleasi	1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Miscela di reazione A	250 µL	500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® AMLplex ^{QS} Primer Mix	Miscela primer	63 µL	250 µL	4 x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Multi Taq2 DNA polimerasi	10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Control cDNA Kasumi 1	cDNA di controllo Kasumi 1	10 µL	10 µL	10 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Allelic Ladder	Ladder allelico	25 µL	25 µL	4 x 25 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Standard di lunghezza del DNA 550 (BTO)	13 µL	50 µL	200 µL

Attenzione: non mischiare i componenti di diversi kit. Una panoramica dei numeri di lotto è indicata sull'etichetta situata all'interno dell'aletta della scatola. Non è consentita un'aliquotazione dei componenti del kit in altri contenitori per reazioni.

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 16, pagina 29.

Nota: la confezione in formato 10 delle reazioni non è più in vendita.

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

Prodotto	Grandezza della confezione	Ord. N.
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 Menytype® **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)	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 Taq 2 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 Kasumi 1 incluso nel kit anzitutto su 250 ng/µL con acqua priva di nucleasi (1:2, ad esempio 1 µL Control cDNA Kasumi 1 + 1 µL Nuclease-Free Water).

Per il controllo positivo, al posto del Template-cDNA 1 µL, utilizzare il controllo positivo diluito cDNA Kasumi 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 Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL)	0,4 µL
Volume complessivo del Mastermix	24,0 µL
Control cDNA Kasumi 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 Taq 2 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 Taq 2 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 5 000 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 Taq 2 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 Preparazione dei prodotti per PCR

Al termine della PCR rimuovere i campioni dal termociclatore e centrifugarli brevemente. Scongelare i reagenti formamide Hi-Di™ (non contenuto nel kit) e DNA Size Standard 550 (BTO), mescolare brevemente le provette e centrifugarle brevemente. Preparare il composto descritto nella Tabella 10 con formamide Hi-Di™ e il DNA Size Standard 550 (BTO), quindi aggiungere al composto una o due reazioni per compensare gli errori di pipettaggio.

Tabella 10 Composto della miscela di denaturazione

Componenti	Volumi per reazione
Formamide Hi-Di™	12,0 µL
Size Standard 550 (BTO)	0,5 µL

Pipettare 12 µL della miscela di denaturazione con formamide e DNA Size Standard 550 (BTO) nel numero corrispondente di pozzetti di una piastra per PCR (idonea per l'uso nel Genetic Analyzer). Quindi aggiungere 1 µL di prodotto PCR o 1 µL di scala allelica del Mentype® **AMLplex^{QS}** in ogni pozzetto. Chiudere la piastra per PCR con una pellicola adatta, miscelare nel vortex e centrifugare brevemente. Rimuovere la pellicola e chiudere la piastra con il setto del produttore del dispositivo.

Nota: la scala allelica è usata per determinare correttamente i frammenti analizzati durante l'analisi dei dati. In ogni ciclo di analisi della lunghezza dei frammenti la scala allelica deve essere analizzata almeno una volta per assicurare il successo dell'analisi dei dati.

Nota: i capillari del dispositivo per elettroforesi su gel non devono funzionare a secco. Se i campioni non occupano tutte le posizioni dei capillari, riempire gli altri pozzetti della piastra con 12 µL di formamide Hi-Di™ secondo il numero di capillari.

Denaturare i prodotti per PCR preparati su un termociclatore per PCR per 3 minuti a 95 °C, quindi raffreddare i campioni nel termociclatore fino a 4 °C. Centrifugare brevemente i campioni prima dell'analisi della lunghezza dei frammenti.

9.2 Analisi della lunghezza dei frammenti

Le istruzioni generali per il dispositivo di analisi, la creazione della matrice e l'uso del software GeneMapper™ sono reperibili nel relativo manuale di istruzioni *ABI PRISM® Genetic Analyzer User's Manual*.

Dopo avere eseguito con successo la calibrazione spettrale del dispositivo per elettroforesi capillare su gel con il reagente Matrix Standard BT5 (Biotype GmbH), creare uno specifico modulo di corsa (ABI 310, ABI 3130) o un protocollo strumentale (ABI 3500) con i seguenti parametri:

Tabella 11 Parametri di corsa specifici per l'analisi della lunghezza dei frammenti del Mentype® **AMLplex^{QS}**

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

Diversamente dai valori riportati nella Tabella 11, il tempo di corsa può essere adattato per analizzare tutti i frammenti (60-550 bp) del DNA Size Standard 550 (BTO).

Nota: seguire le istruzioni del produttore del dispositivo di elettroforesi capillare su gel per impostare gli specifici parametri di corsa.

Nota: osservare anche le ulteriori informazioni per la calibrazione e uso dei prodotti Mentype® sui dispositivi di elettroforesi capillare su gel, disponibili su richiesta tramite support@biotype.de da Biotype GmbH.

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 12), 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 alleli 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 12 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 13):

Tabella 13 Parametri per la creazione manuale di un metodo di analisi in GeneMapper™ ID/ID-X

Parametri	Impostazione
Peak Detection Algorhythm	Advanced
Allele	No specific stutter ratio, set all to 0.0 Amelogenin cut off: 0.0
Ranges	Analysis: Full Range Sizing: All Sizes
Smoothing and Baselineing	Smoothing: Light Baseline Window: 51 pts
Size Calling Method	Local Southern Method
Peak Detection	Peak Amplitude Thresholds B: 200; Y: 200; G: 200; R: 200; O: 50 Min. Peak Half Width: 2 pts Polynomial Degree: 3 Peak Window Size: 15 pts* 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 DNA 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 DNA Size Standard 550 (BTO, Figura 1) 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 1).

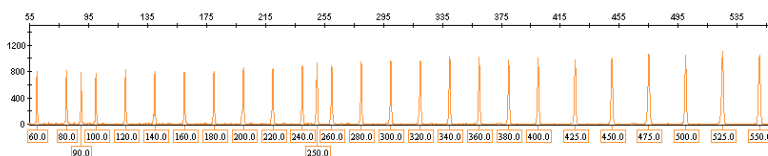


Figura 1 Elettroferogramma della DNA Size Standard 550 (BTO), analizzato su ABI 3500, software GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, asse y: 55-560 bp, asse x: 0-1 500 RFU

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/Allelic Ladder

La scala allelica contiene tutti i frammenti rilevabili con Mentype® **AMLplex^{QS}** (si veda Tabella 1 nonché Figura 2). 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 14).

Tabella 14 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.

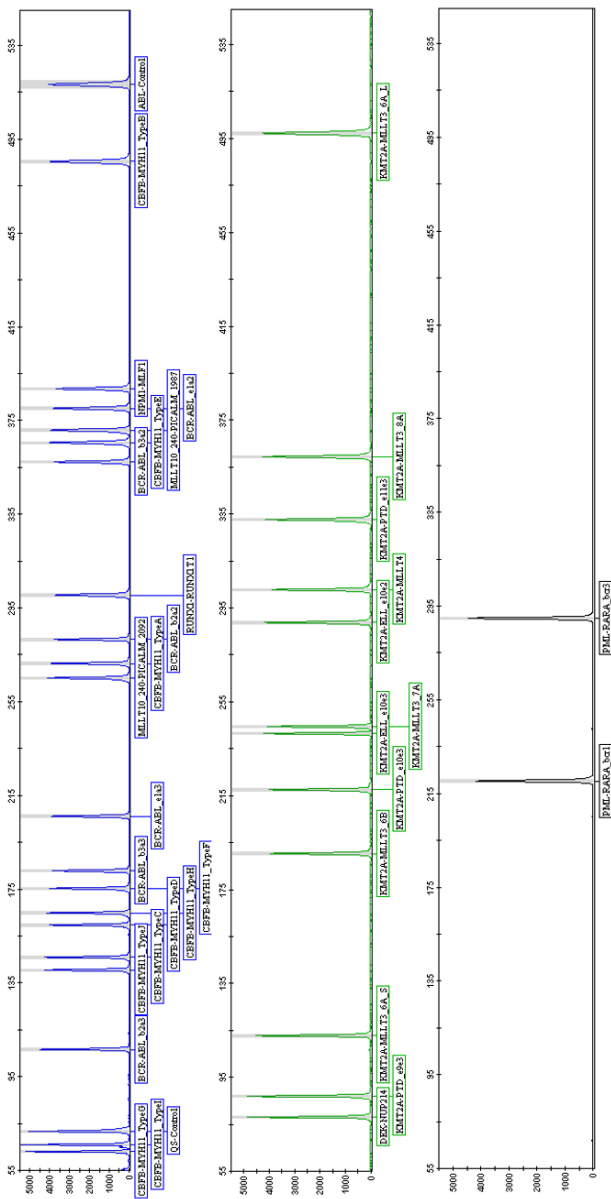


Figura 2 Elettroferogramma della scala allelica, analizzato su ABI 3500, valutazione con GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, asse y: 55-550 bp, asse x: 0-5 500 RFU

10.2.4 Verifica del controllo cDNA Kasumi 1

Il kit Mentype® **AMLplex^{QS}** contiene la verifica del controllo positivo cDNA Kasumi 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 3). 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}**.

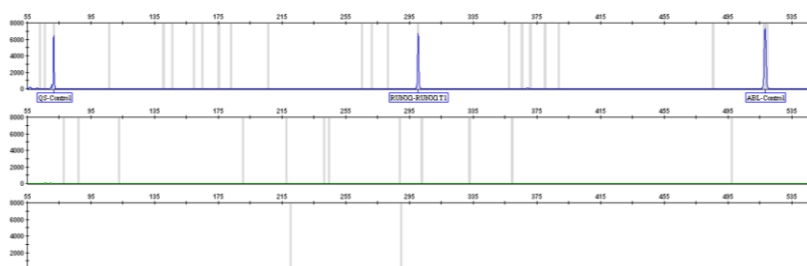


Figura 3 Elettroferogramma del Control cDNA Kasumi 1, analizzato su ABI 3500, GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, asse y 55-550 bp, asse x 0-8 000 RFU

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 4).

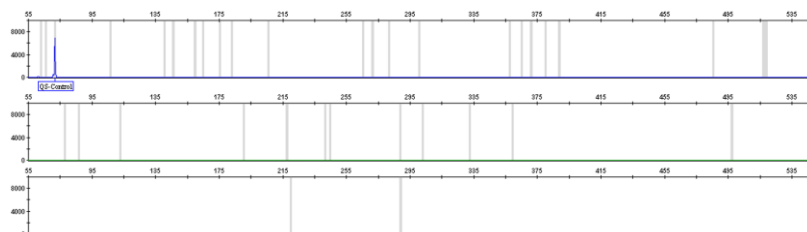


Figura 4 Elettroferogramma di un Non Template Control, analizzato su ABI 3500, GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, asse y 0-10 000 RFU, asse x 55-550 bp

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 5).

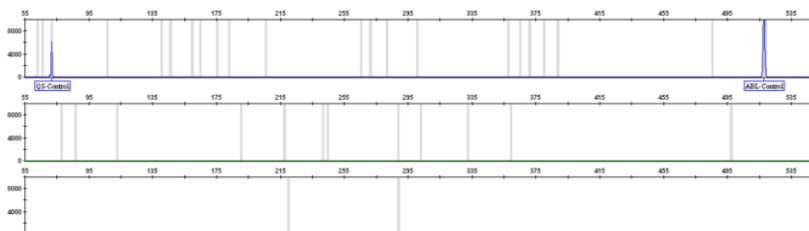


Figura 5 Elettroferogramma di un campione di controllo negativo, analizzato su ABI 3500, GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, asse y 0-10 000 RFU, asse x 55-515 bp

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 15 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 15 Panoramica sulle lunghezze dei frammenti delle singole traslocazioni nella scala allelica di Mentype® **AMLplex**^{QS}, rilevate con l'utilizzo di POP-4™; † 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 $\leq 1\ 000$ copie per 32 varianti su 34 trascrizioni. Le varianti di trascrizione CFBF-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 CFBF-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 16 Informazioni d'ordine dettagliate dei kit Mentype® **AMLplex^{QS}**

Kit	Grandezza della confezione	Numero d'ordine
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
	Denominazione del lotto
	Sufficiente per <N> test
	Riferimento alle istruzioni per l'uso in formato elettronico
	Utilizzabile fino al
	Limite di temperatura
	Numero d'ordine
	Diagnostici in vitro
	Proteggere dalla luce
	Tenere in un luogo asciutto

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 sull'accuratezza 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 Kingdom National Quality Assessment Schemes (UKNEQAS, www.ukneqas.org.uk) per il rilevamento di traslocazioni BCR-ABL e AML. Questi si svolgono regolarmente (2 x) 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 100-1 000 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 kariogramma (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, * [8]

Gen-fusion	Biomarcatori		Evaluation of Clinical Performance Testing (n=292)						
	Aberrazione cromosomica	Variante	Prevalenza [%] *	Corretto Positivo	Corretto Negativo	Errato Positivo	Errato Negativo	Sensibilità diagnostica [%]	Specificità diagnostica [%]
RUNX1-RUNX1T1	t(8;21)(q22;q22)	NA	7	14	277	0	1	93.3	100.0
BCR-ABL	t(9;22)(q34;q11)	e1a3 e1a2 b3a2 b3a3 b2a2 b2a3	1	1	291	0	0	100.0	100.0
PICALM-MLLT10	t(10;11)(p13;q14)	MLLT10_240- PICALM_1987 MLLT10_240- PICALM_2092	1	0	262	0	0	NA	100.0
CBFB-MYH11	inv(16)(p13;q22)	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, Piseigna S, Diverio D. The AML1 gene: a transcription factor involved in the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemias. *Haematologica*. 1997 May-Jun;82(3):364-70. *Review. 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 thrombocythemic onset may be associated with different BCR/ABL variant transcripts. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998 Feb;101(1):75-7. PubMed PMID: 9460506.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Díaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. Standardized RTPCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1901-28.

Biotype GmbH

Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN / GERMANY

Tel. +49 351 8838 400

Fax +49 351 8838 403

support@biotype.de

www.biotype.de