



Mentype[®] AMLplex^{QS}

PCR Amplification Kit

Návod k použití

Důkaz chromozomálních aberací
Akutní myeloidní leukémie

Diagnostika in vitro



AMLIFU01v3cz
Červenec 2021



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



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
D-01109 DRESDEN
GERMANY

Vyrobena v Německu

Společnost Biotype GmbH vyvíjí, vyrábí a prodává aplikace pro lékařskou diagnostiku, založené na PCR (polymerázová řetězová reakce).

Naše testovací sady Mentype® zaručují nejvyšší standardy kvality.

V případě informací a podnětů jsme vám ochotně k dispozici. Kontaktujte nás nebo navštivte naši domovskou stránku www.biotype.de.

Obsah

1. Použití v souladu s určením	5
2. Základní informace.....	5
3. Popis produktu Mentype® AMLplex^{QS}	5
3.1 Nástroje	7
3.2 Typ vzorků	7
4. Výstražná a bezpečnostní upozornění.....	8
4.1 Zajišťování kvality.....	8
5. Materiály dodané společně se sadou	9
5.1 Obsah sady	9
5.2 Informace o objedávce	9
5.3 Reagencie a vybavení, které jsou potřebné navíc (nejsou součástí sady)	10
6. Skladování	11
7. Pracovní postup Mentype® AMLplex^{QS}	12
7.1 Příprava vzorků a použité objemy cDNA.....	12
7.1.1 Izolace RNA	12
7.1.2 Transkripce RNA na cDNA	12
7.1.3 Použití vzorů cDNA	12
7.2 Příprava master mixu	13
7.2.1 Pozitivní kontrola	13
7.2.2 Negativní kontrola	14
7.3 Reakční objem	14
8. Program PCR a amplifikace	15
9. Kapilární gelová elektroforéza	16
9.1 Příprava produktů PCR.....	16
9.2 Analýza délky fragmentu (fragmentační analýza).....	16
10. Vyhodnocení dat	18
10.1 Software a předlohy pro vyhodnocení	18
10.2 Postup při vyhodnocování dat	19
10.2.1 Všeobecné minimální požadavky při vyhodnocování dat.....	19
10.2.2 Kontrola standardu délky DNA Size Standard 550 (BTO).....	20
10.2.3 Kontrola alelického ladderu/Allelic Ladder	20
10.2.4 Test Control cDNA Kasumi 1	23
10.2.5 Test negativní kontroly	23
10.2.6 Vyhodnocení dat vzorků.....	24
11. Řešení problémů	26
11.1 Detekční limit	26
11.2 Průsvity (Pull-up Peaks)	26
11.3 Přidání nukleotidů, které je nezávislé na vzoru	26
11.4 Artefakty	27

11.5 Vliv typu polymeru	27
12. Objednací informace	28
13. Reference	29
14. Značky a vyloučení ručení	30
15. Symboly.....	31
Verifikace a validace sad Mentype® AMLplex^{QS} pro amplifikaci PCR.....	32
A Analytická validace.....	32
A a) Stanovení standardní reakce a tolerancí specifických pro šarže	32
A b) Testování přesnosti měření	32
A c) Testování analytické specifčnosti	33
A c) a) Testování analytické specifčnosti podle předběžně negativně typizovaných cDNA	33
A c) b) Testování analytické specifčnosti podle předběžně pozitivně typizované cDNA	33
A d) Testování analytické senzitivity	33
A e) Testování různých termocyclerů PCR	34
A f) Testování vlivu různých teplot annealingu v PCR.....	34
A g) Testování různých pufrových šarží PCR.....	34
A h) Trvanlivost po otevření	35
B Klinické údaje o výkonu.....	36
B a) Odběr vzorků, etická a regulační hlediska.....	36
B b) Srovnávací testování.....	36
B c) Extrakce DNA a přečištění.....	36
B d) Výsledky	36
B e) Literatura o biomarkerech a jejich sekvencích DNA.....	38

Mentype® AMLplex^{QS}

1. Použití v souladu s určením

Sada Mentype® AMLplex^{QS} je určena pro kvalitativní důkaz 34 variant genových transkriptů, které mohou vzniknout v případě určitých subtypů akutní myeloidní leukémie (AML) chromozomálními translokacemi (somatické mutace) s podílem 11 různých genových fúzí.

Aplikace Mentype® AMLplex^{QS} jsou určeny výhradně pro profesionální použití ve specializovaných laboratořích. Personál by měl být vyškolen pro techniky PCR a použití diagnostiky in vitro.

2. Základní informace

Důkaz specifických chromozomálních aberací má velký prognostický význam, a je proto nezbytný pro diagnostiku akutních leukémií. Identifikace specifických genetických translokací umožňuje klasifikaci subtypů leukémie, čímž podporuje léčbu pacientů, která je přizpůsobena riziku.

Sada Mentype® AMLplex^{QS} umožňuje robustní identifikaci pro léčbu významných chromozomálních aberací, které jsou základem akutní myeloidní leukémie (AML). Tuto identifikaci lze v rutinní diagnostice pomocí této sady snadno provést.

3. Popis produktu Mentype® AMLplex^{QS}

Mentype® AMLplex^{QS} identifikuje při metodě s využitím několika parametrů 34 transkripčních variant následujících fúzních genů: RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL, PICALM-MLLT10, CBFB-MYH11, DEK-NUP214, KMT2A-MLLT4, KMT2A-MLLT3, KMT2A-ELL, KMT2A-PTD, NPM1-MLF1 a PML-RARA (srv. Tabulka 1).

Výsledky Mentype® AMLplex^{QS} jsou zabezpečeny dvěma interními kontrolami. Interní kontrola PCR (senzor kvality „QS-Control“) zobrazuje úspěšnost amplifikační reakce; „kontrola cDNA“ (ABL-Control) je připojena k sadě pro zobrazení kvality použité cDNA.

Test se provádí fragmentační analýzou pomocí kapilární gelové elektroforézy. Primery jsou značeny fluorescenčními barvivy **6-FAM**, **BTG** nebo **BTY**.

Tabulka 1 Genové fúze a varianty transkriptů, které lze prokázat pomocí Mentype® **AMLplex**^{QS}

Genová fúze	Chromozomální aberace	Varianta
RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO)	t(8;21) (q22;q22)	-
BCR-ABL	t(9;22) (q34;q11)	e1a3 e1a2 b3a2 b3a3 b2a2 b2a3
PICALM-MLLT10 (CALM-AF10)	t(10;11) (p13;q14)	MLLT10_240-PICALM_1987 MLLT10_240-PICALM_2092
CBFB-MYH11	inv(16) (p13;q22)	Type A Type B Type C Type D Type E Type F Type G Type H Type I Type J
DEK-NUP214 (DEK-CAN)	t(6;9) (p23;q34)	-
KMT2A-MLLT4 (MLL-AF6)	t(6;11) (q27;q23)	-
KMT2A-MLLT3 (MLL-AF9)	t(9;11) (p22;q23)	6A_(THP-1) 7A_(10A) 8A_(MM6) 6B_(9B)
KMT2A-ELL (MLL-ELL)	t(11;19) (q23;p13.1)	e10e2 e10e3
KMT2A-PTD (MLL-PTD)	Parciální tandemová duplikace	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 Nástroje

Sady Mentype® **AMLplex^{QS}** byly verifikovány a validovány na těchto cyclerech PCR:

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

Sady byly verifikovány a validovány na těchto systémech kapilární gelové elektroforézy za použití POP-4™ (Applied Biosystems™) a délky kapilár 36 cm, použití POP-7™ bylo verifikováno:

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

Vyhodnocení dat bylo verifikováno pomocí těchto softwarových verzí:

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

Použití sad Mentype® **AMLplex^{QS}** na jiných nástrojích nebo s jiným softwarem než s tím, který je uveden výše, musí být uživatelem validováno a verifikováno na vlastní odpovědnost.

3.2 Typ vzorků

Mentype® **AMLplex^{QS}** byly validovány s cDNA, transkribované z RNA, která byla izolována z plné krve s citrátem.

Produkt Mentype® **AMLplex^{QS}** je validován pro použití 1 µL cDNA, která bude validována z 1 µg RNA v reakčním objemu 20 µL. Použití větších množství cDNA musí být uživatelem validováno.

4. Výstražná a bezpečnostní upozornění

Řiďte se prosím bezpečnostními listy (BL) produktů Biotype, které vám na vyžádání ochotně zašleme (support@biotype.de). Pro bezpečnostní listy reagensů, které nejsou obsaženy v testovací sadě, kontaktujte prosím příslušného výrobce.

Před použitím produktu si pozorně přečtěte návod k použití.

Po obdržení produktu a jeho složek zkontrolujte, zda je kompletní - počet, typ a plnění (viz kapitola 5.1, Obsah sady), správné označení, zmrazený stav reagensů a neporušenost jejich obalu.

Při použití testů noste rukavice, laboratorní plášť a popř. ochranu očí.

Zabraňte kontaminaci vzorků nukleázou (DNáza / RNáza) použitím jednorázových pipetových špiček bez DNázy / RNázy s filtry absorbujícími aerosol.

Použijte oddělené pracovní prostory pro přípravu vzorků (pre-PCR), preparaci mastermixu a následnou úpravu vzorků a analýzu (post-PCR). Pozitivní kontroly skladujte v prostoru odděleném od složek sady.

Podle směrnic nebo požadavků místních, státních a / nebo federálních předpisů či akreditačních organizací mohou být potřebné dodatečné kontroly.

Nepoužívejte složky sady, které překročily své datum skončení trvanlivosti a nemíchejte šarže.

Odpady ze vzorků a testů likvidujte podle místních bezpečnostních ustanovení.

Do šarže LEUK01095 (Reaction Mix A šaržeCH2001597):

V této sadě je obsažena následující potenciálně nebezpečná látka:

Tabulka 2 Potenciálně nebezpečné složky sad Mentype® AMLplex^{QS}

Složka sady	Chemikálie	Nebezpečí
Reaction Mix A	Azid sodný NaN ₃	Toxický při polknutí, při kontaktu s kyselinou vyvíjí toxické plyny

4.1 Zajišťování kvality

Celý obsah testovací sady je podrobován intenzivnímu zajištění kvality ve společnosti Biotype GmbH. Kvalita testovacích sad je nepřetržitě kontrolována, aby byla dokumentována neomezená použitelnost. V případě dotazů na zajištění kvality nás prosím kontaktujte na e-mailovou adresu info@biotype.de.

5. Materiály dodané společně se sadou

5.1 Obsah sady

Sady Mentype® **AMLplex^{QS}** obsahují tyto složky, které postačí pro provedení 25, 100 nebo 400 reakcí.

Tabulka 3 Velikosti balení a složky obsažené v sadách Mentype® **AMLplex^{QS}**

Titulek	Obsah	Objem na velikost balení		
		25 reakcí	100 reakcí	400 reakcí
Nuclease-Free Water	Voda neobsahující nukleázy	1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Reakční směs A	250 µL	500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® AMLplex^{QS} Primer Mix	Směs primerů	63 µL	250 µL	4 x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Multi Taq2 DNA polymeráza	10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® AMLplex^{QS} Control cDNA Kasumi-1	Kontrolní cDNA Kasumi-1	10 µL	10 µL	10 µL
Mentype® AMLplex^{QS} Allelic Ladder	Alelický žebříček	25 µL	25 µL	4 x 25 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	DNA délkový standard 550 (BTO)	13 µL	50 µL	200 µL

Mějte na paměti, že komponenty soupravy z různých šarží soupravy nesmí být smíchány. Přehled čísel šarží je uveden na etiketě, která je umístěna na vnitřní straně klopky krabice. Rozdělování komponent soupravy do jiných reakčních nádob není povoleno.

5.2 Informace o objednavce

Písemnou objednávku prosím zašlete e-mailem na sales@biotype.de. Objednávka musí obsahovat objednávací čísla podle Tabulka 4 a Tabulka 16, strana 28.

Poznámka: Mějte prosím na paměti, že reakce o velikosti balení 10 se již neprodávají.

Tabulka 4 Objednávací čísla sad Mentype® **AMLplex^{QS}**

Produkt	Velikost balení	Obj. č.
Mentype® AMLplex^{QS}	25 reakcí	45-31220-0025
Mentype® AMLplex^{QS}	100 reakcí	45-31220-0100
Mentype® AMLplex^{QS}	400 reakcí	45-31220-0400

5.3 Reagencie a vybavení, které jsou potřebné navíc (nejsou součástí sady)

Pro počáteční kalibraci zařízení pro kapilární gelovou elektroforézu na specifická fluorescenční barviva sady Menytype® **AMLplex^{QS}** musí být provedena spektrální kalibrace pomocí následující reagentie firmy Firma Biotype GmbH (Tabulka 5):

Tabulka 5 Navíc požadované reagentie společnosti Biotype GmbH

Reagentie	Použití	Velikost balení	Obj. č.
Matrix Standard BT5 single (Matricový standard)	Spektrální kalibrace systému kapilární gelové elektroforézy (jedna kapilára)	5 x 25 µL	00-10411-0025
Matrix Standard BT5 multi (Matricový standard)	Spektrální kalibrace systému kapilární gelové elektroforézy (více kapilár)	25 µL	00-10421-0025
Matrix Standard BT5 multi (Matricový standard)	Spektrální kalibrace systému kapilární gelové elektroforézy (více kapilár)	2 x 25 µL	00-10421-0050

K provedení sady jsou potřebné tyto obecné materiály a nástroje:

- stolní centrifuga s rotorem pro 2 mL reakční nádoby
- mikrotitrační destičky s 96 jamkami nebo 0,2 mL reakční trubičky, v případě použití mikrotitračních destiček s 96 jamkami vhodná víka nebo fólie, centrifuga s rotorem na mikrotitrační destičky
- mixér Vortex, vhodný pro mikrotitrační destičky s 96 jamkami nebo 0,2 mL reakční trubičky
- pipety, pipetové špičky s filtry (jednorázové)
- jednorázové rukavice bez pudru
- Vhodná sada na izolaci RNA (srv. kapitola 7.1.1, Izolace RNA)
- vhodný nástroj pro kvantitativní měření koncentrace RNA po izolaci a přečištění (srv. kapitola 7.1.1, Izolace RNA)
- vhodná sada pro transkripci RNA na cDNA (srv. 7.1.2, Transkripcie RNA na cDNA)
- blok ledu pro krátkodobé skladování polymerázy
- vhodný cycler PCR (srv. kapitola 3.1, Nástroje)
- Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems™)
- reagentie a spotřební materiály systému kapilární gelové elektroforézy
- vhodný nástroj na kapilární gelové elektroforézu (srv. kapitola 3.1, Nástroje)

Upozornění: Zajistěte, aby byly všechny přístroje instalovány, prováděna jejich údržba a kalibrovány podle podmínek výrobce. Přesvědčte se, že jsou k dispozici všechny reagentie k provozování příslušného PCR a nástroje pro kapilární gelové elektroforézu (viz návod k použití od příslušného výrobce přístroje).

6. Skladování

Sady Mentype® **AMLplex^{QS}** jsou expedovány na tuhém oxidu uhličitém. Složky sady budou doručeny zmrazené. Pokud by jedna nebo více složek nebylo po obdržení zmrazených, nebo by došlo k poškození zkumavek během přepravy, obraťte se pro další podporu na společnost Biotype GmbH (support@biotype.de).

Složky musí být skladovány při -25 °C až -15 °C. Kontrolní cDNA a reagentie post-PCR (alelické laddery a size standard BTO) by měly být skladovány odděleně od reagentií PCR.

Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení. Maximální počet 20 cyklů rozmrazení a zmrazení nesmí být překročen.

Sady Mentype® **AMLplex^{QS}** musí být uchovávány tak, aby byly chráněny před světlem.

Trvanlivost testovací sady je uvedena na obalovém štítku.

7. Pracovní postup Mentype® AMLplex^{QS}

7.1 Příprava vzorků a použité objemy cDNA

7.1.1 Izolace RNA

Kvalita izolované RNA má rozhodující vliv na výkon a kvalitu celého testovacího systému. Musí být zajištěno, aby byl systém použitý k izolování RNA kompatibilní s technologií PCR.

Následující sady byly testovány pro izolaci RNA a jsou vhodné k použití:

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

Použití alternativních sad pro izolování RNA musí být na vlastní odpovědnost validováno uživatelem.

Upozornění: Pro přesné výsledky je zapotřebí kvantifikace RNA (např. pomocí kvantifikace RNA prostřednictvím UV/VIS spektroskopie při A260 nm a stanovení kvality prostřednictvím poměru A260 / A280, který by měl být v rozmezí 1,7 až 2,0).

7.1.2 Transkripce RNA na cDNA

Po provedení izolace a kvantifikace RNA se provede transkripce na cDNA pomocí běžně dostupných sad. Použití RNA 1 µg v reakční sestavě 20 µL. Transkripční reakce byla validována.

Následující sady byly testovány pro transkripci a jsou vhodné k použití:

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

Použití alternativních transkripčních sad musí být na vlastní odpovědnost validováno uživatelem.

7.1.3 Použití vzorů cDNA

Sada Mentype® AMLplex^{QS} byla optimalizována pro použití 1 µL cDNA (bez zředění), která byla připravena tak, jak je popsáno v 7.1.2.

Množství vzorů může být v případě kritických vzorků pacienta zvýšeno. Maximálně by měla být použita 1/10 objemu reakce RT. V reakční sestavě sady Mentype® AMLplex^{QS} je třeba upravit objem vody bez nukleázy upravit tak, aby byl celkový objem směsi PCR vždy 25 µL. Tento postup musí validovat uživatel na vlastní odpovědnost.

7.2 Příprava master mixu

Všechny reagentie by měly být před nasazením mastermixu dobře smíchány a krátce centrifugovány (cca 10 s). Multi Taq 2 DNA polymerázu uložte během manipulace na blok ledu.

Celkový objem PCR reakce musí být vždy 25 μL .

U počtu nasazovaných reakcí PCR vždy přihlížejte k pozitivním a negativním kontrolám. K celkovému počtu přidejte jednu nebo dvě reakce, abyste kompenzovali chybu pipetování.

Následující přehled ukazuje objemy použitých složek sady s 1,0 μL objemem vzorků (vzory cDNA) a reakčním objemem 25 μL .

Tabulka 6 Sestava master mixu pro reakci Mentype® **AMLplex**^{QS} při použití 1 μL cDNA

Součást	Objem na sestavu 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
Celkový objem mastermixu	24,0 μL
Template cDNA	1,0 μL

* obsahuje Mg^{2+} , dNTPs, BSA

7.2.1 Pozitivní kontrola

Kontrolní pozitivní kontrolu cDNA Kasumi 1, obsaženou v sadě, nejprve nařed'te beznukleázovou vodou na 250 ng/ μL (1:2, např. 1 μL Control cDNA Kasumi 1 + 1 μL Nuclease-Free Water).

Pro pozitivní kontrolu použijte místo vzoru cDNA 1 μL zředěné pozitivní kontroly Control cDNA Kasumi 1. Do reakční nádoby s master mixem PCR napipetujte místo vzoru cDNA kontrolní cDNA.

Následující přehled ukazuje objemy použitých složek sady s 1 μL kontrolní cDNA a reakčním objemem 25 μL .

Tabulka 7 Sestava master mixu pro reakci Mentype® **AMLplex**^{QS} s použitím 1 µl vzorku pozitivní kontroly

Součást	Objem na sestavu 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
Celkový objem mastermixu	24,0 µL
Mentype® AMLplex ^{QS} Control cDNA Kasumi-1	1,0 µL

* obsahuje Mg²⁺, dNTPs, BSA

7.2.2 Negativní kontrola

Jako negativní kontrolu (No Template Control) napipetujte do reakčních nádob s předlohovým master mixem PCR 1 µL beznukleázové vody.

Následující přehled ukazuje objemy použitých složek sady s 1 µL „beznukleázové vody a reakčním objemem 25 µL.

Tabulka 8 Sestava master mixu negativní kontroly pro reakci Mentype® **AMLplex**^{QS}

Součást	Objem na sestavu 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
Celkový objem mastermixu	24,0 µL
Negativní kontrola - beznukleázová voda	1,0 µL

* obsahuje Mg²⁺, dNTPs, BSA

Navíc lze rovněž vést již známou cDNA, která je ohledně prokazatelných genových fúzí a translokací negativní, jako negativní kontrolní vzorek. Je třeba ji zpracovat jako normální vzorek a použít v PCR jako extra reakci.

7.3 Reakční objem

Napipetujte 24 µL master mixu PCR do reakčních nádob nebo na multimikrotitrační destičku. Pak přidejte 1 µL cDNA nebo 1 µL pozitivní či negativní kontroly.

Po pipetování musíte reakční nádoby, resp. multimikrotitrační destičky zavřít. Reakční směsi krátce promíchejte a centrifugujte a poté je dejte do cycleru PCR za účelem amplifikace.

8. Program PCR a amplifikace

Pro aktivaci DNA polymerázy Multi Taq 2 a pro potlačení tvorby nespecifických amplifikačních produktů by měl být proveden „**hot start**„.

Aby byl stanoven počet potřebných cyklů PCR, může být jako reference použita interní kontrola ABL. V důsledku toho by výška píku neměla překročit specifikovaný měřicí rozsah zařízení (např. 500 až 5 000 RFU u ABI 3130).

Z důvodu příliš nízké koncentrace cDNA může dojít ke statistickým výpadkům (Allelic Dropouts) a nevyváženostem výšek píků. Se zvyšujícím se počtem cyklů stoupá pravděpodobnost nespecifických amplifikačních produktů.

Upozornění: Pro optimální rovnováhu sady by měla být rychlost ohřevu a chlazení přístrojů PCR nastavena na 4 °C/s.

Tabulka 9 Parametry amplifikace PCR pro implementaci přípravku Mentype® **AMLplex^{DS}**

Teplota	Čas	Počet cyklů
96 °C	4 min.	1 x (hot start pro aktivaci Multi Taq2 DNA polymerázy)
96 °C	30 s	
61 °C	120 s	22 - 28 x
72 °C	75 s	
68 °C	10 min.*	1 x
10 °C	∞	hold

Pokud dojde ke zvýšeným hladinám adeninových píků (-1 bp), může být tento krok prodloužen na max. 60 min.

Počet cyklů je závislý na použitém množství cDNA a úrovni exprese detekované transkripční varianty. Byly testovány počty cyklů mezi 22 a 28. Pro referenční vzorky z materiálu buněčné kultury (vysoká míra exprese) doporučujeme snížení cyklů PCR na 22 cyklů. Pro dosažení maximální citlivosti (11.1 Detekční limit) doporučujeme použít maximální počet 28 cyklů.

9. Kapilární gelová elektroforéza

9.1 Příprava produktů PCR

Po dokončení PCR odeberte vzorky z cykléru a krátce odstřed'te. Rozmrazte reagentie Hi-Di™ formamid (není součástí soupravy) a DNA Size Standard 550 (BTO), zkumavky krátce promíchejte a krátce odstřed'te. Připravte si směs Hi-Di™ Formamidu a DNA Size Standard 550 (BTO) popsanou v tabulce 10, přidejte jednu nebo dvě reakce navíc pro kompenzaci chyb pipetování.

Tabulka 10 Složení denaturační směsi

Součásti	Objem na reakci
Hi-Di™ formamid	12,0 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µL

Pipetujte 12 µL denaturované směsi formamidu a DNA Size Standard 550 (BTO) do příslušného počtu jamek na PCR destičce (vhodné pro použití v genetickém analyzátoru). Pak přidejte buď 1 µL PCR produktu nebo 1 µL alelického markeru (Allelic Ladder) Mentype® **AMLplex^{QS}** na jamku. PCR destičku utěsněte vhodnou fólií, vortexujte a krátce odstřed'te.

Upozornění: Alelický marker se používá ke správné identifikaci fragmentů hodnocených během analýzy dat. V každém běhu fragmentační analýzy musí být alelický marker analyzován alespoň jednou, aby byla zajištěna úspěšná analýza dat.

Upozornění: Kapiláry přístroje pro gelovou elektroforézu by neměly běžet nasucho. Pokud se vzorky nenacházejí ve všech pozicích kapilár, doplňte další jamky destičky 12 µL Hi-Di™ formamidem podle čísla kapiláry.

Připravené PCR produkty denaturujte v PCR cykléru po dobu 3 minut při 95 °C, poté ochlad'te v cykléru na 4 °C. Vzorky krátce před fragmentační analýzou odstřed'te.

9.2 Analýza délky fragmentu (fragmentační analýza)

Obecné pokyny pro analyzátor, přípravu matrice a použití softwaru GeneMapper™ naleznete v příslušném průvodci *ABI PRISM® Uživatelská příručka pro genetický analyzátor*.

Po úspěšném dokončení spektrální kalibrace přístroje pro kapilární gelovou elektroforézu se standardem Matrix BT5 (Biotype GmbH) vytvořte specifický „run modul“ (ABI 310, ABI 3130) nebo „instrument protokol“ (ABI 3500) s následujícími parametry:

Tabulka 11 Specifické parametry pro run module, nebo instrument protokol přístroje pro kapilární gelovou elektroforézu, 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

Na rozdíl od hodnot uvedených v tabulce 11 lze „run time“ upravit tak, aby se analyzovaly všechny fragmenty (60-550 bp) velikostního standardu 550.

Upozornění: Při nastavování specifických parametrů analýzy postupujte podle pokynů výrobce přístroje na kapilární gelovou elektroforézu.

Upozornění: Vezměte na vědomí také další informace o kalibraci a aplikaci produktů Mentype® na kapilární gelové elektroforéze. Jsou k dispozici na vyžádání na adrese support@biotype.de od Biotype GmbH.

10. Vyhodnocení dat

10.1 Software a předlohy pro vyhodnocení

Vyhodnocování dat se provádí pomocí softwaru GeneMapper™ ID nebo GeneMapper™ ID-X (Applied Biosystems™).

Pro jednoduché vyhodnocení dat nabízí firma Biotype GmbH na www.biotype.de hotová nastavení (Tabulka 12), která mohou být importována do příslušné verze GeneMapper™ a nahrazují manuální vytvoření analytických parametrů.

Upozornění: Import a přiřazení alel pomocí nabízených předloh vyhodnocení může být garantováno jen pro software GeneMapper™ ID/ID-X. Pokud byste použili GeneMapper™, může dojít k problémům při importu některých předloh vyhodnocení.

Upozornění: Dostupné předlohy pro biny a sadu panelů definují délku jednotlivých fragmentů. Následkem mírných rozdílů ve výkonů jednotlivých přístrojů pro kapilární gelovou elektroforézu může dojít k lehkým odchylkám mezi přístroji. Společnost Biotype GmbH může biny a panely specificky upravit. Za tím účelem nás prosím kontaktujte na support@biotype.de.

Tabulka 12 Přehled dostupných předloh pro import do GeneMapper™ ID/ID-X

Předloha	Název	
Panely	AMLplex_Panels_v2/v2x	Nebo vyšší verze
BinSets	AMLplex_Bins_v2/v2x	Nebo vyšší verze
Size Standard	SST-BTO_60-550bp	
Analysis Method	AMLplex_HID_310_200RFU	Doporučeno
	AMLplex_HID_3130_200RFU	Doporučeno
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Setting	Table for 10 Alleles	
	Table for 22 Alleles	

Pokud by byla analytická metoda vytvořena manuálně, je třeba zvolit tyto parametry (Tabulka 13):

Tabulka 13 Parametry pro manuální vytvoření analytické metody v GeneMapper™ ID/ID-X

Parametr	Nastavení
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: Světlo 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

* Pokud je to třeba, je možné zmenšit velikost okna piků na 11 pts.

10.2 Postup při vyhodnocování dat

10.2.1 Všeobecné minimální požadavky při vyhodnocování dat

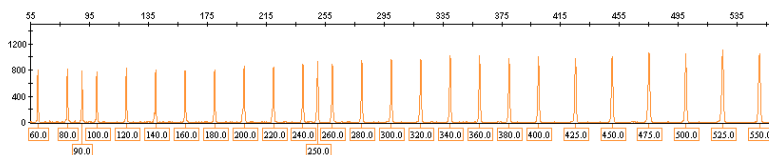
Soubory fsa kapilární gelové elektroforézy jsou kvalitativně vyhodnocovány. To znamená, že je u nich kontrolována přítomnost amplifikátových piků. Platí, že pik musí dosáhnout minimální výše 200 RFU a přitom by měl být alespoň třikrát tak velký jako hluk pozadí základní linie. Tato kritéria platí pro kontrolní piky (kontrola QS a ABL) i pro piky genových fúzí.

Jedinou výjimku tvoří standard velikosti DNA Size Standard 550 (BTO), zde je třeba dosáhnout minimální výšky piků 50 RFU.

10.2.2 Kontrola standardu délky DNA Size Standard 550 (BTO)

Stanovení přesných délek fragmentů amplifikovaných produktů je závislé na použitém standardu délky DNA. Z důvodu komplexnosti některých míst by k určení délky mělo být použito co nejvíce rovnoměrně rozložených referenčních bodů. Použijte standard délky DNA Size Standard 550 (BTO, Obrázek 1) s délkami fragmentů 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 a 550 bp.

V elektroferogramu (oranžový kanál) všech vzorků zkontrolujte, že jsou k dispozici všechny alely standardu velikosti, mají dostatečnou výšku píku alespoň 50 RFU a byly správně přiřazeny (srv. Obrázek 1).



Obrázek 1 Elektroferogram standardu velikosti Size Standard 550 (BTO), analyzovaný na ABI 3500, software GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, osa y: 55-560 bp, osa x: 0-1 500 RFU

Upozornění: Pokud by v různých vzorcích nebyly analyzovány všechny fragmenty standardu velikosti, mohou být alelický ladder a vzorky nedostatečně vyhodnoceny. Proto vždy zkontrolujte úspěšnou analýzu standardu velikosti.

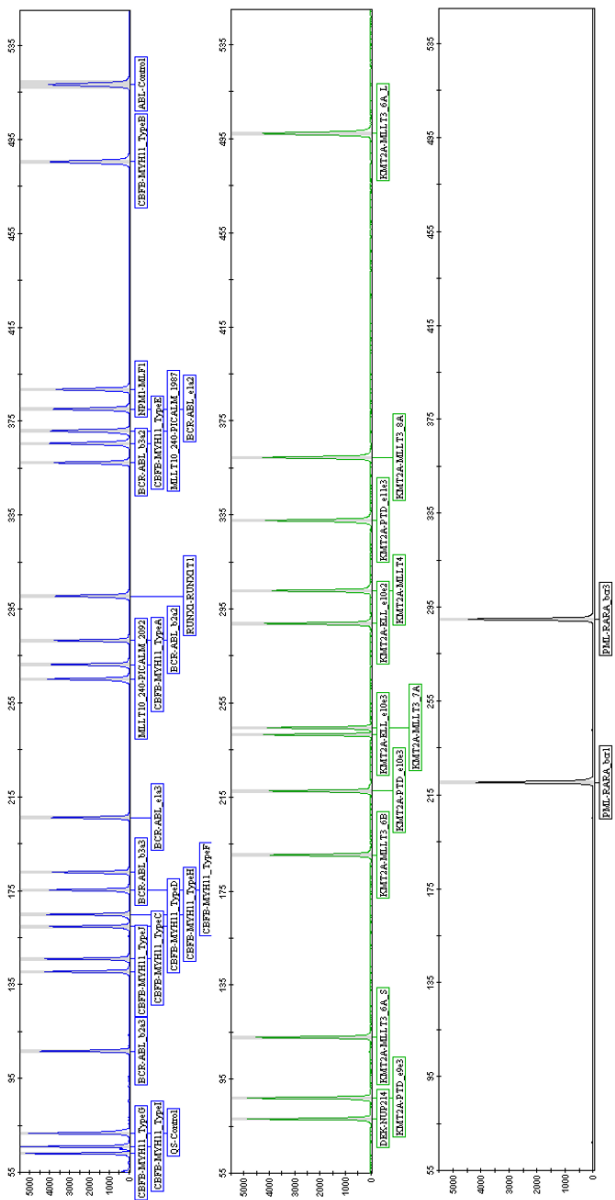
10.2.3 Kontrola alelického ladderu/Allelic Ladder

Alelický ladder obsahuje všechny fragmenty, které lze prokázat pomocí Mentype® **AMLplex^{QS}** (srv. Tabulka 1 a Obrázek 2). Tyto fragmenty musejí být v alelickém ladderu analogicky přítomné a mít prokazatelnou výšku alespoň 200 RFU. Fúzní geny a příslušné varianty transkriptů se vždy nacházejí v barevném kanálu (Tabulka 14).

Tabulka 14 Přehled rozložení genových fúzí na barevné kanály

Modrý barevný kanál	Zelený barevný kanál	Žlutý barevný kanál
CBFB-MYH11	DEK-NUP214 (DEK-CAN)	PML-RARA
BCR-ABL	KMT2A-MLLT4 (MLL-AF6)	
PICALM-MLLT10 (CALM-AF10)	KMT2A-MLLT3 (MLL-AF9)	
RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO)	KMT2A-ELL (MLL-ELL)	
NPM1-MLF1	KMT2A-PTD (MLL-PTD)	
Kontrola QS a ABL		

Upozornění: Pokud by všechny fragmenty alelického ladderu nebyly při použití vyhodnocovacích vzorů (především binů a sad panelů) automaticky pojmenovány, obraťte se prosím na support@biotype.de, protože může být nutné přizpůsobit templáty vašemu nastavení. V takovém případě může chybět přiřazení píků ve vzorcích.



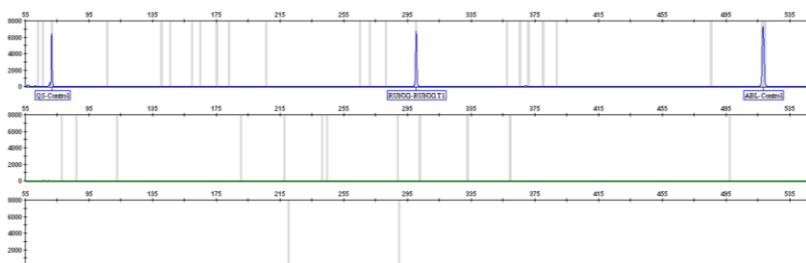
Obrázek 2 Elektroferogram alelického ladderu, analyzovaný na ABI 3500, vyhodnocení pomocí GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, osa y: 55-550 bp, osa x: 0-5 500 RFU

10.2.4 Test Control cDNA Kasumi 1

Sada Mentype® **AMLplex^{QS}** obsahuje pozitivní kontrolu Control cDNA Kasumi 1*, která je pozitivní pro genovou fúzi RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO).

Zkontrolujte, zda se vyskytují kontrolní píky QS-Control a ABL-Control s dostatečnou výškou. Zkontrolujte, zda se v elektroferogramu vyskytuje pík pro translokaci RUNX1-RUNX1T1 s dostatečnou výškou (Obrázek 3). Zkontrolujte, zda se v elektroferogramu nevyskytují žádné neočekávané vedlejší produkty.

*Buněčná kultura pro vytvoření cDNA byla odebrána od: DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Německo. Použití této cDNA je určeno výhradně pro Mentype® **AMLplex^{QS}**.

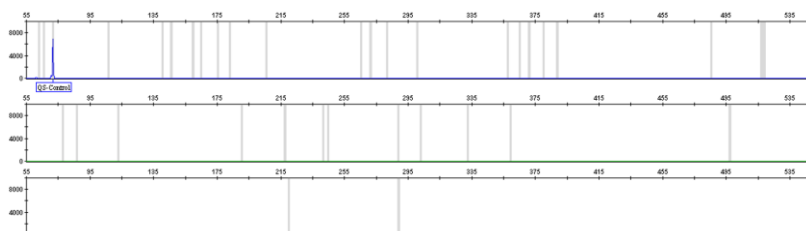


Obrázek 3 Elektroferogram Control cDNA Kasumi 1, analyzovaný na ABI 3500, GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, osa y 55-550 bp, osa x 0-8 000 RFU

10.2.5 Test negativní kontroly

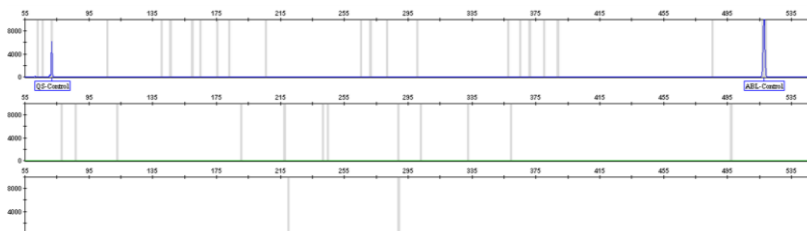
Zkontrolujte, zda se v elektroferogramu (kanál modrý, zelený, žlutý) nevyskytují píky specifické pro translokaci, které jsou větší než 200 RFU.

No-Template Control: Zkontrolujte, zda se vyskytuje jen kontrolní pík QS-Control s dostatečnou výškou, nikoli však pík ABL-Control Peak (Obrázek 4).



Obrázek 4 Elektroferogram Non Template Control, analyzovaný na ABI 3500, GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, osa y 0-10 000 RFU, osa x 55-550 bp

Negativní kontrolní vzorek: Zkontrolujte, zda se v případě známé cDNA, která je pro prokazatelné genové fúze a translokace negativní, vyskytují kontrolní píky QS-Control a ABL-Control s dostatečnou výškou (Obrázek 5).



Obrázek 5 Elektroferogram negativního kontrolního vzorku, analyzovaný na ABI 3500, GeneMapper™ ID-X 1.4, Template Files v3x, osa y 0-10 000 RFU, osa x 55-515 bp

10.2.6 Vyhodnocení dat vzorků

Po provedení kontroly standardů velikostí, alelického ladderu a kontrolních vzorků proběhne vyhodnocení dat vzorků.

Upozornění: Mentype® **AMLplex^{QS}** je čistě kvalitativní test. Kvantitativní vyhodnocení, např. v rámci MRD, výslovně není možné.

Při použití vyhodnocovacích předloh od společnosti Biotype GmbH a úspěšném vyhodnocení alelického ladderu během budou detekované fragmenty PCR automaticky pojmenovány. Přehled délek fragmentů produktů PCR najdete v Tabulka 15.

Upozornění: Byla provedena validace a certifikace Mentype® **AMLplex^{QS}** na POP-4™. Použití jiného polymeru (např. POP-7™ nebo POP-6™) může změnit vlastnosti běhu specifických produktů PCR. Podle okolností je nutná úprava templátů Biotype panelů a sady binů). Prosím obraťte se na naši technickou podporu (support@biotype.de). Dále byl pozorován zvýšený šum pozadí z důvodu změněných vlastností volných zbytků fluorescenčních barviv.

Tabulka 15 Přehled délek fragmentů jednotlivých translokací v alelickém ladderu Mentype® **AMLplex^{QS}**, stanovený za použití POP-4TM; ‡ pro variantu KMT2A-MLLT3_6A jsou očekávány dva amplikony; * Z důvodu proměnlivé délky ampliconu PML-RARA_bcr2 (cca 173 bp) nemůže být varianta automaticky přiřazena, lze ji však detekovat pomocí primerů Mentype® **AMLplex^{QS}**

Panel/translokace	Velikost [bp]	Panel/translokace	Velikost [bp]
Modrý kanál		Zelený kanál	
CBFB-MYH11_TypeG	63	DEK-NUP214	78
CBFB-MYH11_TypeI	66	KMT2A-PTD_e9e3	87
QS-Control	72	KMT2A-MLLT3_6A_S [‡]	113
BCR-ABL_b2a3	107	KMT2A-MLLT3_6B	191
CBFB-MYH11_TypeJ	141	KMT2A-PTD_e10e3	218
CBFB-MYH11_TypeC	146	KMT2A-ELL_e10e3	242
CBFB-MYH11_TypeD	160	KMT2A-MLLT3_7A	245
CBFB_MYH11_TypeH	165	KMT2A-ELL_e10e2	289
CBFB_MYH11_TypeF	175	KMT2A-MLLT4	303
BCR-ABL_b3a3	183	KMT2A-PTD_e11e3	333
BCR-ABL_e1a3	206	KMT2A-MLLT3_8A	360
MLLT10_240-PICALM_2092	265	KMT2A-MLLT3_6A_L [‡]	498
CBFB-MYH11_TypeA	271	Žlutý kanál	
BCR-ABL_b2a2	282	PML-RARA_bcr1	220
RUNX1-RUNX1T1	301	PML-RARA_bcr3	288
BCR-ABL_b3a2	358	<i>PML_RARA_bcr2*</i>	
CBFB-MYH11_TypeE	365		
MLLT10_240-PICALM_1987	371		
BCR-ABL_e1a2	380		
NPM1-MLF1	389		
CBFB-MYH11_TypeB	486		
ABL-Control	518		

11. Řešení problémů

Výše popsané vyhodnocení Post-PCR s automatickým přiřazením alel zaručuje přesné a spolehlivé rozlišení transkriptů genových fúzí a jejich variant. V každém běhu prosím zkontrolujte správné přiřazení alel v alelickém ladderu.

11.1 Detekční limit

V experimentech s plazmidy byl v případě počtu 25 cyklů stanoven detekční limit $\leq 1\ 000$ kopií pro 32 ze 34 variant transkriptů. Od nich se odlišují varianty transkriptů CFBF-MYH11_Type C a MLL-AF6. V případě počtu 28 cyklů může být určeno 1 000 kopií CFBF-MYH11_Type C a 10 000 kopií KMT2A-MLLT4 (MLL-AF6). Pokud jsou uvedené počty kopií k dispozici, může být dosaženo výšek píků > 200 RFU.

U této aplikace se jedná o screeningový nástroj, založený na PCR, který byl vyvinut, validován a certifikován pro klasifikaci subtypů AML. Tato aplikace není vhodná pro kvantifikaci nebo monitoring minimální reziduální choroby (MRD).

11.2 Průsvity (Pull-up Peaks)

Pokud byla použita nevhodná matrice pro analýzu nebo jsou výšky píků produktu PCR mimo oblast lineární detekce zařízení, může dojít k průsvitům mezi barevnými panely. Objeví se ve stejné poloze jako specifické píky v jiných barevných panelech (zpravidla s nižší intenzitou signálu).

Upozornění: Pokud je to nutné, nařed'te před kapilární gelovou elektroforézou produkty PCR, abyste získali výsledky, které lze jednoznačně vyhodnotit. V případě průsvitu navzdory optimálním výškám fluorescence by měla být matrice obnovena.

11.3 Přidání nukleotidů, které je nezávislé na vzoru

Na základě své terminální transferázové aktivity přidává Multi Taq 2 DNA polymeráza přednostně na 3'-konec amplifikovaného fragmentu DNA adenosin. Pokud nemá systém PCR na extenzi dostatek času, nebo primární sekvence extenzi nepodporují, toto přidání se neuskuteční. Tento artefakt je identifikovatelný na základě výskytu fragmentu zkráceného o bázi (-1 bp pík). Všechny primery Biotype jsou upraveny tak, aby byla tvorba tohoto artefaktu minimalizována. Navíc je tvorba artefaktu omezena závěrečným extenzním krokem v protokolu PCR (68 °C po dobu 10 min.). Výška píku artefaktu se v případě vysokého množství cDNA zvyšuje. Pro hodnocení píků by měla každá analytická laboratoř stanovit vlastní limitní hodnoty.

11.4 Artefakty

Teplota místnosti může vlastnosti běhu produktů PCR produktů na kapilárních zařízeních silně ovlivnit a příliš nízká teplota způsobí výskyt dvojitých piků (Split Peaks). Navíc může být negativně ovlivněno automatické přiřazení alel. Pokud by byly tyto efekty pozorovány, doporučujeme opětovné nastříknutí vzorků, případně i s více alelickými laddery na jeden běh. Dbejte prosím na to, aby byla dodržena pracovní teplota doporučená výrobcem zařízení. Optimální jsou stabilní pokojové teploty > 22 °C.

11.5 Vliv typu polymeru

Byla provedena validace a certifikace Mentype® **AMLplex^{QS}** na POP-4™. Použití jiného polymeru (např. POP-7™ nebo POP-6™) může změnit vlastnosti běhu specifických produktů PCR. Podle okolností je nutná úprava templátů Biotype panelů a sady binů). Prosím obraťte se na naši technickou podporu (support@biotype.de). Dále byl pozorován zvýšený šum pozadí z důvodu změněných vlastností volných zbytků fluorescenčních barviv.

12. Objednací informace

Tabulka 16 Podrobné objednací informace o sadách Mentype® **AMLplex^{QS}**

Sada	Velikost balení	Objednací číslo
Mentype® AMLplex^{QS}	25 reakcí	45-31220-0025
Mentype® AMLplex^{QS}	100 reakcí	45-31220-0100
Mentype® AMLplex^{QS}	400 reakcí	45-31220-0400

13. Reference

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. Značky a vyloučení ručení

Registrované názvy, značky atd.. použité v tomto dokumentu, nelze považovat za nechráněné, i když nejsou jako registrované výslovně označeny: 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.).

Sady Mentype[®] **AMLplex^{qs}** jsou sady s označením CE podle evropské směrnice 98/79/ES pro diagnostika in vitro. Sady nejsou dostupné jako diagnostika in vitro mimo tuto regulační oblast.

15. Symboly



Výrobce



Označení šarže



Dostatečné pro testy <N>



Odkaz na eIFU



Lze použít do



Omezení teploty



Objednáací číslo



Diagnostika in vitro



Chraňte před světlem



Udržujte v suchu

Verifikace a validace sad Mentype® AMLplex^{QS} pro amplifikaci PCR

A Analytická validace

A a) Stanovení standardní reakce a tolerancí specifických pro šarže

Cíl: Stanovení standardní reakce a tolerancí specifickou pro šarže vzhledem k absolutním výškám signálu (RFU), vyváženosti výšek signálu multiplexní PCR a základní linie. Dále budou podle výsledků stanovena test specifická nastavení zařízení pro genotypizaci pomocí kapilární gelové elektroforézy (biny a panely) za použití vyhodnocovacích předloh automatických sekvenátorů DNA.

Metodika: K testovací sadě je připojena kontrolní cDNA buněčné linie KASUMI-1 (ACC220, Leibnitzův ústav DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig), která obsahuje genovou fúzi AML1-ETO a chromozomální aberaci (8; 21) (q22; q22) [7]. Dále byla použita umělá ekvimolární vzorová směs plazmidů, která obsahuje 33 ze 34 detekovatelných variant. Standardní reakce se uskutečnila pomocí kontrolní cDNA ve jmenovité koncentraci 250 ng na sestavu PCR a 25 cyklů PCR. Vzorová směs byla nastavena tak, aby bylo po 25 cyklech PCR dosaženo výšek signálu v lineárním měřicím rozsahu použitých analytických zařízení (max. 5 000 RFU). Bylo provedeno čtyřnásobné určení s rovněž čtyřmi slepými hodnotami (no template control, NTC) bez DNA.

Výsledky: Pro smíchání primerů PCR, specifické pro šarži, byly stanoveny tyto specifikace: Při použití genetického analyzátoru ABI PRISM® 310 bylo docíleno výšek signálu 1 000-4 000 RFU a při použití genetického analyzátoru ABI PRISM® 3130 bylo docíleno výšek signálu 1 000-5 000 RFU při použití templátové směsi. Specifické signály jsou detekovány od výšky signálu 200 RFU. V rozsahu měřítka nebyly u slepých hodnot detekovány žádné nespecifické signály (volná barviva, artefakty) > 200 RFU (základní linie).

A b) Testování přesnosti měření

Cíl: Informace o správnosti měřicí metody a dostatečně podrobné shrnutí dat, které umožňuje vyhodnotit, zda jsou prostředky ke zjišťování správnosti přiměřené. Měření správnosti jsou pro kvantitativní i kvalitativní testy použitelná jen tehdy, pokud je dostupná referenční norma nebo metoda.

Metodika: Sada je validována pravidelnou účastí na kruhových testech a kontrolována ohledně správné kvalitativní výpovědi (diagnostika). Biotype se od 03.06.2013 pravidelně zúčastňuje kruhových testů United Kindom National Quality Assessment Schemes (UKNEQAS, www.ukneqas.org.uk) pro detekci BCR-ABL a translokací AML. Ty se konají pravidelně (2 x) ročně a vyhodnocuje je úřad. Výsledky (Performance Status) i v porovnání s jinými účastníky jsou zasílány po účasti.

Výsledky: Dosavadní performance status je „zelený“. Produkt je prokazatelně vhodný pro důkaz variant BCR-ABL a translokací AML a v porovnání s ostatními molekulárně genetickými metodami dosahuje správných výsledků (kvalitativně).

A c) Testování analytické specifčnosti

A c) a) Testování analytické specifčnosti podle předběžně negativně typizovaných cDNA

Cíl: Zkoumání slouží k vyloučení chybně pozitivních výsledků v důsledku interferenční a křížové reaktivity s vybranými cDNA předběžně negativně typizovaných vzorků (pacienti a zdraví dárci).

Metodika: Bylo testováno 22 cDNA, které byly v translokačních variantách prokazovaných v testovací sadě předběžně negativně typizovány. Použitá množství měla pokrýt rozsah koncentrací, očekávaných v klinické praxi, a činila 145 ng až max. 934 ng cDNA na sestavu PCR s 25 cykly.

Výsledky: V alelické oblasti stanovené biny a panely (šablony) (> 200 RFU) nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita. Měřicí signál pro interní kontrolu cDNA (gen ABL) činil u 21 cDNA > 200 RFU, v jednom případě cca 50 RFU. Limitní hodnota pro automatické přiřazení alel byla nastavena na 200 RFU.

A c) b) Testování analytické specifčnosti podle předběžně pozitivně typizované cDNA

Cíl: Zkoumání sloužilo k vyloučení chybně pozitivních výsledků v důsledku interferenční a křížové reaktivity primerů s vybranými cDNA od předběžně pozitivně typizovaných pacientů.

Metodika: Bylo testováno 20 cDNA, které byly v translokačních variantách prokazovaných v testovací sadě předběžně pozitivně typizovány. Použitá množství bylo stanovena na 250 ng cDNA na sestavu PCR. Program PCR byl proveden s 25 cykly.

Výsledky: Všechny předem určené somatické mutace byly jednoznačně prokázány. V alelické oblasti nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita (> 50 RFU). Měřicí signály pro somatické mutace a interní kontrolu cDNA (gen ABL) činily u 16/20 vzorků > 200 RFU a > 50 RFU u 3/20 vzorků. Jeden vzorek dosáhl jen hodnot nižších než 50 RFU, varianta fúzních genů však byla stále ještě detekovatelná. Limitní hodnota pro automatické přiřazení alel byla nastavena na 200 RFU.

A d) Testování analytické senzitivity

Cíl: Zkoumání sloužila k určení analytické hranice dokazatelnosti testu (senzitivita).

Metodika: Bylo testováno sériové ředění s 1 µg až 31,25 ng referenční cDNA (Kasumi-1) ve čtyřnásobném určení. Program PCR byl proveden s 25 cykly. Dále byla pro každou dokazovanou variantu transkriptu testována sériová ředění uměle vyrobeného referenčního vzoru (plazmidy, GeneArt, Life Technologies).

Výsledky: Až do koncentrace cDNA 62,5 ng byly pro specifickou translokaci u pro kontrolu ABL prokázány signály o intenzitě > 200 RFU. Při 31,25 ng činily

intenzity signálu specifické varianty > 200 RFU, intenzity signálu kontroly ABL > 50 RFU. Optimálních hodnot vzhledem k rozsahu měření kapilárního sekvenátoru bylo dosaženo v oblasti 150 ng–250 ng. Z měření plazmidových zředění vyplynulo, že pro všechny translokační varianty může být dosaženo hranice dokazatelnosti > 200 RFU z 100-1 000 kopií.

A e) Testování různých termocyclerů PCR

Cíl: Termocyclery PCR různých výrobců se liší svými specifikacemi. Mohou existovat zejména rozdílné rychlosti ohřevu a chlazení i rozdílné techniky regulace teploty.

Metodika: Testování standardních reakcí pomocí kontrolní DNA ve jmenovité koncentraci 250 ng byla provedena těmito termocyclery ve čtyřnásobném určení se stejným master mixem a 2 slepými zkouškami bez DNA: Termocycler Eppendorf Mastercycler ep-S (Eppendorf AG, Hamburg), Applied Biosystems® GeneAmp 9700 se stříbrným blokem (Life Technology GmbH, Darmstadt), Applied Biosystems® GeneAmp 9700 s hliníkovým blokem (Life Technology GmbH, Darmstadt).

Výsledky: Na všech typech termocyclerů bylo možné provést správné přiřazení všech amplifikátů. Všechny fragmenty vzorové směsi byly úspěšně amplifikovány.

A f) Testování vlivu různých teplot annealingu v PCR

Cíl: Pro určení odolnosti PCR je simulováno kolísání teploty pro krok hybridizace primerů (annealing) multiplexní PCR. Tento teplotní krok je kritický pro senzitivitu a specifitost PCR.

Metodika: Pro sadu specifická teplota annealingu 60 °C standardní reakce pomocí kontrolní DNA ve jmenovité koncentraci 250 ng byla změněna o ± 1 °C a ± 2 °C. Bylo provedeno trojnásobné určení se stejným master mixem.

Výsledky: Sada je při kolísání ± 1 °C, způsobeném technikou přístroje stabilní o vykázanou teplotu annealingu. Optimálních výšek signálu všech systémů je dosahováno s teplotou annealingu 61 °C.

A g) Testování různých pufrových šarží PCR

Cíl: Poměry koncentrace obsažených látek pufru PCR - reakční směs A (dNTP, koncentrace iontů, zejména Mg^{2+}) jsou rozhodující pro senzitivitu, specifitost a vyváženost signálů v multiplexní PCR. Proto je testována odolnost testu vůči kolísání šarží zároveň dodaného pufru PCR.

Metodika: Testování 3 nezávislých šarží REM-A proběhlo ve standardní reakci s kontrolní DNA jmenovité koncentrace 250 ng, alelickým ladderem a linií cDNA se slabou expresí (MLL-AF6).

Výsledky: Každá nově vyrobená šarže je testována amplifikační sadou Mentype® **AMLplex^{QS}**. Šarže REM A je uvolněna jen tehdy, pokud se dosažené výsledky s Mentype® **AMLplex^{QS}** nacházejí uvnitř specifikace.

A h) Trvanlivost po otevření

Cíl: Byla testována stabilita reagensů sady PCR po opakovaném zmrazení a rozmrazení.

Metodika: Reagencie sady byly podrobeny cyklu dvacetinásobného zmrazení a rozmrazení. Zmrazení bylo provedeno minimálně na 1 hod. při -20 °C. Rozmrazení proběhlo při pokojové teplotě a reagencie byly před použitím homogenizovány protřepáním. Poté byla provedena standardní reakce s kontrolní DNA jmenovité koncentrace 250 ng a doplňujícími slepými hodnotami bez DNA v trojnásobném určení. Bylo provedeno hodnocení v porovnání se standardní reakcí bez cyklu zmrazení a rozmrazení.

Výsledky: Odchylka zjištěných výšek píků v porovnání se standardní reakcí činila maximálně 20 % (zejména ztráta signálu). U slepých hodnot nebyly zjištěny žádné dodatečné píky > 50 RFU v rámci rozsahu měřítka.

B Klinické údaje o výkonu

B a) Odběr vzorků, etická a regulační hlediska

Byla provedena kontrola hodnocení výkonu podle § 20 až § 24 zákona o lékařských výrobcích (DE). Zproštění schvalovací povinnosti pro lékařské výrobky s nízkým bezpečnostním rizikem podle § 7 nařízení o klinických zkouškách lékařských výrobků bylo uděleno Spolkovým ústavem pro léčiva a lékařské výrobky. K dispozici bylo kladné hlasování příslušné etické komise a prohlášení o souhlasu pacienta.

Byla použita plná venózní krev od 297 pacientů a 10 zdravých probandů.

B b) Srovnávací testování

Primární cílovou veličinou je stanovení diagnostických senzitivit a specifických v porovnání s referenčními metodami. Pro výběr translokací byly k dispozici standardizované cytogenetické metody (karyotypizace, analýzy FISH) [8]. Pro translokace, které nemohly být znázorněny cytogeneticky, byly použity validované a etablované testy monoplex-nested PCR [9, 10].

B c) Extrakce DNA a přečištění

Z heparinizované plné krve byly pomocí centrifugace v gradientu hustoty získány mononukleární buňky (MNC). Následně byla s použitím extrakčních sad mRNA, které lze zakoupit, získána celková mRNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, DE). Ta byla pomocí komerčně dostupných sad transkribována na cDNA (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen GmbH, Hilden, DE). Kvalita cDNA byla testována pomocí PCR v reálném čase (validovaný test in-house). Jednotlivé fúzní geny, resp. mutace, byly zkontrolovány pomocí validovaných jednotlivých PCR.

B d) Výsledky

Sada pro amplifikaci PCR Mentype® **AMLplex**^{QS} nevykázala pomocí cDNA 10 zdravých probandů žádné mutace. K těmto výsledkům nebylo při dalších výsledných výpočtech přihlédnuto. Následně bylo zkoumáno 297 vzorků od pacientů. Z toho nebylo možné vyhodnotit 5 vzorků (kontrolní signál pro ABL pod doporučenou prahovou hodnotou). Ze zbylých 292 vzorků bylo 199 identifikováno v porovnání s karyotypizací, FISH a/nebo kontrolní PCR jako správně negativních. Ze správně negativních vzorků vykazovalo 56 vzorků v karyogramu genetické změny (chromozomové anomálie), které nebyly testovací sadou rozpoznány. To lze vysvětlit tím, že sada pro amplifikaci PCR Mentype® **AMLplex**^{QS} sice zahrnuje nejčastější translokace, avšak pokrývá jen 37 % genetických abnormalit, které jsou u AML často pozorovány [8]. Jednotlivé výsledky srovnávacích testování jsou shrnuty v tabulce 17.

Celkově bylo dosaženo diagnostické senzitivity 94 % a diagnostické specifické 99,5 %. Všechny nálezy, verifikované pomocí kontrolní PCR [9, 10], byly jednoznačně potvrzeny.

Tabulka 17: Přehled výsledků kontroly hodnocení výkonu, * [8]

Genová fúze	Biomarker		Prevalence [%] *	Správně pozitivní	Správně negativní	Hodnocení klinického výkonu (n=292)			
	Chromozomální aberace	Varianta				Chybně pozitivní	Chybně negativní	Diagnostická senzitivita [%]	Diagnostická specifickost [%]
RUNX1-RUNX1T1	t(8;21)(q22;q22)	NA	7	14	277	0	1	93.3	100.0
BCR-ABL	t(9;22)(q34;q11)	e1a3 e1a2 b3a2 b3a3 b2a2 b2a3	1	1	291	0	0	100.0	100.0
PICALM-MLLT10	t(10;11)(p13;q14)	MLLT10_240-PICALM_1987 MLLT10_240-PICALM_2092	1	0	262	0	0	NA	100.0
CBFB-MYH11	inv(16)(p13;q22)	Type A Type B Type C Type D Type E Type F Type G Type H Type I Type J	5	25	264	1	2	92.6	99.6
DEK-NUP214	t(6;9)(p23;q34)	NA	1	3	289	0	0	100.0	100.0
KMT2A-MLLT4	t(6;11)(q27;q23)	NA	<0,5	0	292	0	0	NA	100.0
KMT2A-MLLT3	t(9;11)(p22;q23)	6A_(THP-1) 7A_(10A) 8A_(MM6) 6B_(9B)	1	4	287	0	1	80.0	100.0
KMT2A-ELL	t(11;19)(q23;p13.1)	e10e2 e10e3	1	0	291	0	1	0	100.0
KMT2A-PTD	Partial Tandem Duplication	e9e3 e10e3 e11e3	5-7	23	269	0	0	100.0	100.0
NPM1-MLF1	t(3;5)(q25.1;q34)	NA	<0,5	1	291	0	0	100.0	100.0
PML-RARA	t(15;17)(q22;q21)	bcr1 (PR-L) bcr2 (PR-V) bcr3 (PR-S)	13	8	284	0	0	100.0	100.0
Total			37	79	207	1	5	94.0	99.5

B e) Literatura o biomarkerech a jejich sekvencích DNA**Přehledné referáty a citáty databází 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.*

Vybraná literatura o 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. PubMed PMID: 9234595.*

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

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

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

Vybraná literatura o 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.

Vybraná literatura o DEK-CAN, t(6;9)(p23;q34):

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

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

Vybraná literatura o 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

Vybraná literatura o CBFβ-MYH11, inv(16) (p13;q22):

Corbacioglu A, Scholl C, Schlenk RF, Eiwien 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

Vybraná literatura o 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.

Vybraná literatura o 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.

Vybraná literatura o 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.

Vybraná literatura o 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, Kolitz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Bloomfield CD. Long-term disease-free survivors with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and MLL partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood.* 2007 Jun

15;109(12):5164-7. Epub 2007 Mar 6. PubMed PMID: 17341662; PubMed Central PMCID: PMC1890839.

Vybraná literatura o 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.

Vybraná literatura o 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.

Další reference

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, Vigié F, Yau Chun Wan-Senon S, Zasadzinski A, Dessen P. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(Database issue): D920-4.

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

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

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

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

Biotype GmbH

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

Mentype® **AMLplex**^{QS}

AMLIFU01v3cz