

Manual *ipsogen*[®] BCR-ABL1 mbcr Kit



Versiunea 1

IVD

Cantitativ în diagnosticare in vitro

Pentru utilizare cu instrumentele Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®],
LightCycler[®] și SmartCycler[®]



REF

670023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R2

MAT

1072506RO



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN este furnizor de top de tehnologii inovatoare pentru probe și teste, permițând izolarea și detecția conținutului oricărei probe biologice. Produsele și serviciile noastre avansate, de înaltă calitate, asigură succesul, de la prelevarea probei până la rezultat.

QIAGEN stabilește standarde în următoarele domenii:

- Purificarea ADN, ARN și a proteinelor
- Teste efectuate pe acizi nucleici și proteine
- Cercetare microARN și ARN de interferență
- Automatizarea tehnologiilor pentru probe și teste

Misiunea noastră este aceea de a vă permite să obțineți un succes excepțional și realizări ieșite din comun. Pentru mai multe informații, vizitați www.qiagen.com.

Cuprins

Domeniul de utilizare	4
Rezumatul și explicarea produsului	4
Principiul procedurii	5
Materiale furnizate	7
Conținutul kitului	7
Materiale necesare, dar nefurnizate	8
Avertismente și precauții	9
Precauții generale	9
Depozitarea și manipularea reactivilor	10
Procedură	11
Prepararea ARN-ului pentru probă	11
Protocol	
■ Transcriere inversă EAC standardizată recomandată	11
■ qPCR pe instrumente Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM sau Rotor-Gene Q 5plex HRM cu rotor cu 72 de tuburi	14
■ qPCR pe instrumentul ABI PRISM 7000, 7700 și 7900HT SDS și pe instrumentul LightCycler 480	18
■ qPCR pe instrumente LightCycler 1.2 și 2.0	23
■ qPCR pe instrumentul SmartCycler	27
Interpretarea rezultatelor	30
Principiul analizei datelor	30
Rezultate	31
Ghid de depanare	33
Controlul calității	36
Limitări	37
Caracteristici de performanță	37
Studii nonclinice	37
Studii clinice	40
Referințe	42
Simboluri	44
Date de contact	44
Informații pentru comandă	45

Domeniul de utilizare

ipsogen BCR-ABL1 mbc Kit este destinat cuantificării transcripțiilor BCR-ABL p190 în măduva osoasă sau probele de sânge periferic la pacienții cu leucemie acută limfoblastică Ph-pozitivă (LAL) diagnosticați anterior cu un eveniment cu gena de fuziune (Fusion Gene, FG) BCR-ABL mbc. Rezultatele obținute sunt destinate monitorizării eficacității tratamentului la pacienții care urmează tratament și pentru monitorizarea bolii reziduale minime (Minimal Residual Disease, MRD) pentru a monitoriza recidivarea bolii.

Rezumatul și explicarea produsului

Cromozomul Philadelphia (Ph) este cea mai frecventă aberație cariotipică la adulții cu LAL. Acesta apare la 20-30 % dintre pacienții adulți cu LAL în general, incidența crescând la peste 50 % la pacienții cu vârsta de 50 de ani sau mai mult.

În această translocare, segmentul 3' al ABL proto-oncogen de pe cromozomul 9 este juxtapus cu segmentul 5' al genei BCR de pe cromozomul 22. BCR-ABL FG este produsul cromozomului Ph și este o proteină tirozin kinază activă constitutiv.

Rupturile genei ABL apar de obicei în primul intron. Rupturile genei BCR apar, în general, în una dintre următoarele 3 regiuni: o regiune de 5,8 kb care se întinde pe exonii 12-16, numită regiune majoră de regrupare a punctelor de ruptură (Major Breakpoint Cluster Region, Mbc), o secvență de 55 kb a primului intron, numită regiune minoră de regrupare a punctelor de ruptură (Minor Breakpoint Cluster Region, mbc) și regiunea micro de regrupare a punctelor de ruptură (μ -bc).

Punctele de ruptură care apar în mbc unesc exonul 1 (e1) cu al doilea exon al genei ABL (a2), rezultând o transcripție de fuziune mai mică, e1a2, care codifică o proteină himerică de 190 kDa (p190) (Figura 1). Proteina p190 BCR-ABL este observată doar în LAL Ph+, în timp ce proteina p210 BCR-ABL este comună la 20-40 % dintre pacienții cu LAL Ph+ și aproape toți pacienții cu leucemie mieloidă cronică (LMC) Ph+.

Toate formele de proteine de fuziune BCR-ABL prezintă o activitate crescută și dereglată a tirozin kinazei, iar forma p190 s-a dovedit a avea un potențial de transformare mai mare decât p210. Mai mult, această proteină himerică pare să deregleze căile normale de transducție a semnalului dependente de citokine, ceea ce duce la inhibarea apoptozei sau la creșterea independentă a factorului de creștere.

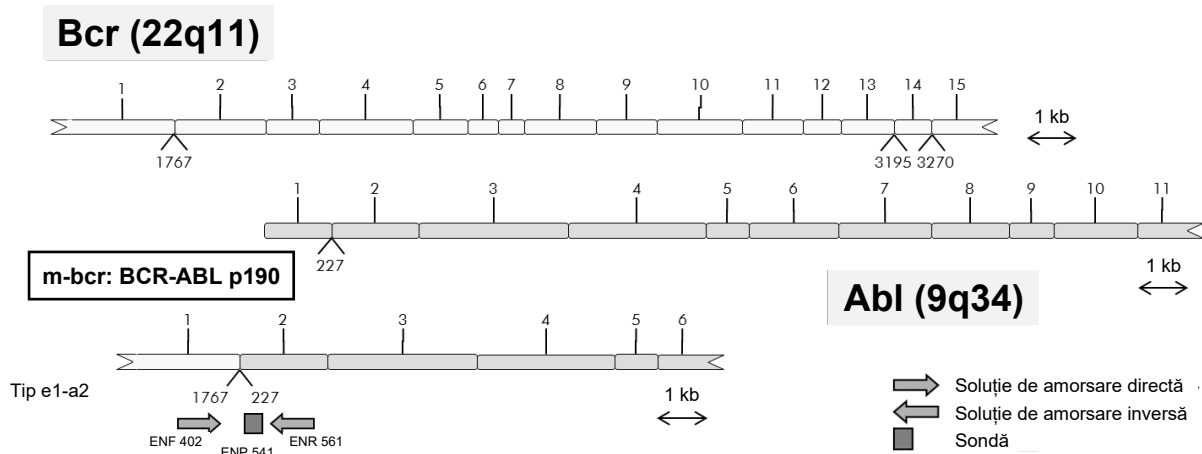


Figura 1. Diagrama schematică a transcripției FG BCR-ABL mbc, acoperită de setul de soluții de amorsare și sonde qPCR: ENF402-ENP541-ENR561. Numărul de sub soluțiile de amorsare și sonde se referă la poziția nucleotidică a acestora în transcripția genei normale.

Tratamentul pacienților cu LAL Ph+ a fost optimizat prin introducerea inhibitorilor de tirozin kinază, ceea ce a îmbunătățit semnificativ supraviețuirea acestor pacienți (pentru examinare, consultați referința 1). Pentru acești pacienți, monitorizarea MRD este obligatorie. Metodologia actuală de măsurare a nivelului MRD implică utilizarea reacției cantitative de polimerizare în lanț (quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) în timp real, prin care numerele de transcripție BCR-ABL sunt legate de numerele de transcripție ale unei gene de control. *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kit se bazează pe această tehnică.

Principiul procedurii

qPCR permite cuantificarea cu precizie a produșilor PCR în timpul fazei exponențiale a procesului de amplificare PCR. Datele cantitative PCR pot fi obținute rapid, fără procesare post-PCR, prin detectarea în timp real a semnalelor fluorescente în timpul și/sau ulterior ciclării PCR, reducând astfel drastic riscul contaminării produșilor PCR. În prezent, sunt disponibile 3 tipuri principale de tehnici qPCR: analiza qPCR folosind SYBR® Green I Dye, analiza qPCR folosind sonde de hidroliză și analiza qPCR folosind sonde de hibridizare.

Acest test exploatează principiul hidrolizei oligonucleotidelor cu colorant dublu qPCR. În timpul PCR, soluție de amorsare directă și cea inversă hibridizează la o secvență specifică. O oligonucleotidă cu dublu colorant se află în același amestec. Această sondă, care constă dintr-o oligonucleotidă marcată cu un colorant raportor 5' și un colorant substanță extincătoare de fluorescență 3' în aval, hibridizează la o secvență țintă în produsul PCR. Analiza qPCR cu sonde de hidroliză exploatează activitatea exonucleazei 5'→3' a *Thermus aquaticus* (*Taq*) ADN polimerază. Când sonda este intactă, proximitatea colorantului raportor față de colorantul substanță extincătoare de fluorescență are ca rezultat suprimarea fluorescenței raportoare în principal prin transferul de energie de tip Förster.

În timpul PCR, dacă ținta de interes este prezentă, sonda se temperează în mod specific între locul soluției de amorsare directe și locul soluției de amorsare inverse. Activitatea exonucleazei 5'→3' a ADN polimerazei scindează sonda între raportor și substanța extincătoare de fluorescență numai dacă sonda hibridizează cu ținta. Fragmentele de sondă sunt apoi îndepărtate de țintă și polimerizarea catenei continuă. Capătul 3' al sondei este blocat pentru a preveni extinderea sondei în timpul PCR (Figura 2). Acest proces are loc în fiecare ciclu și nu interferează cu acumularea exponențială a produsului.

Creșterea semnalului de fluorescență este detectată numai dacă secvența țintă este complementară sondei și, prin urmare, este amplificată în timpul PCR. Din cauza acestor cerințe, amplificarea nespecifică nu este detectată. Astfel, creșterea fluorescenței este direct proporțională cu amplificarea țintei în timpul PCR.

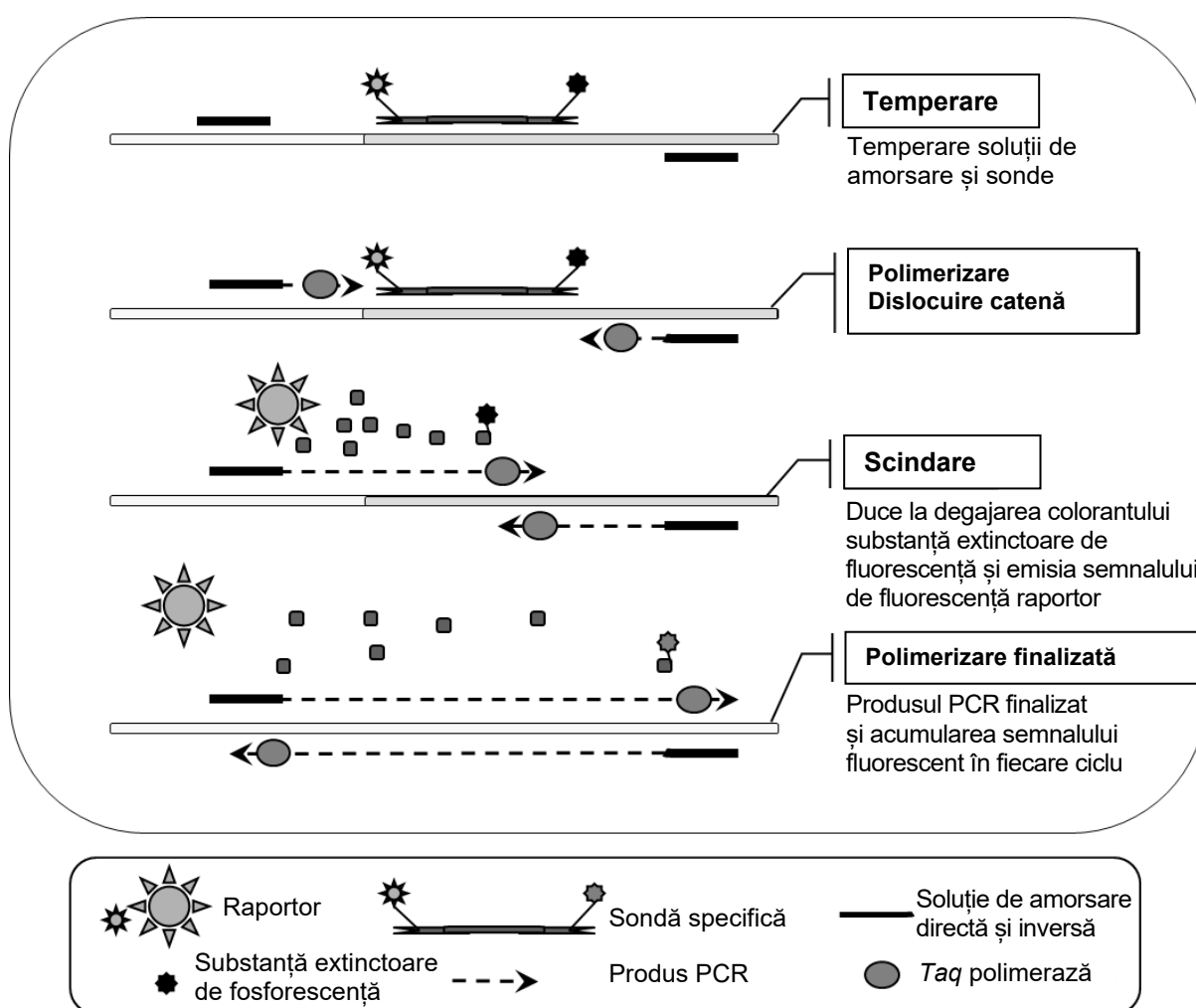


Figura 2. Principiul reacției. ARN-ul total este transcris invers, iar ADN-ul complementar generat este amplificat prin PCR utilizând o pereche de soluții de amorsare specifice și o sondă internă specifică cu colorant dublu (FAM™–TAMRA™). Sonda se leagă de amplicon în timpul fiecărei etape de temperare a PCR. Când Taq ADN polimeraza se extinde de la soluția de amorsare legată de amplicon, aceasta deplasează capătul 5' al sondei, care este apoi degradat de activitatea exonucleazei 5'→3' a Taq ADN polimerazei. Scindarea continuă până când sonda rămasă topește ampliconul. Acest proces eliberează fluoroforul și substanța extincătoare de fluorescență în soluție, separându-le spațial și ducând la o creștere a fluorescenței din FAM și o scădere a fluorescenței din TAMRA.

Materiale furnizate

Conținutul kitului

ipsogen BCR-ABL1 mbc Kit		(24)
Nr. de catalog		670023
Număr de reacții		24
ABL Control Gene Standard Dilution (Diluție standard genă de control ABL) (10^3 copii/5 μ l)	C1-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Diluție standard genă de control ABL) (10^4 copii/5 μ l)	C2-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Diluție standard genă de control ABL) (10^5 copii/5 μ l)	C3-ABL	50 μ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (Diluție standard genă de fuziune BCR-ABL mbc) (10^1 copii/5 μ l)	F1-BCR-ABL e1a2 mbc	50 μ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (Diluție standard genă de fuziune BCR-ABL mbc) (10^2 copii/5 μ l)	F2-BCR-ABL e1a2 mbc	50 μ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (Diluție standard genă de fuziune BCR-ABL mbc) (10^3 copii/5 μ l)	F3-BCR-ABL e1a2 mbc	50 μ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (Diluție standard genă de fuziune BCR-ABL mbc) (10^5 copii/5 μ l)	F4-BCR-ABL e1a2 mbc	50 μ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (Diluție standard genă de fuziune BCR-ABL mbc) (10^6 copii/5 μ l)	F5-BCR-ABL e1a2 mbc	50 μ l
Primers and Probe Mix ABL (Amestec de soluții de amorsare și sonde ABL)*	PPC-ABL 25x	90 μ l
Primers and Probe Mix BCR-ABL mbc Fusion Gene (Amestec de soluții de amorsare și sonde genă de fuziune BCR-ABL mbc)†	PPF-mbc 25x	110 μ l
Manual ipsogen <i>BCR-ABL1 mbc Kit</i> (limba engleză)		1

* Amestec de soluții de amorsare inverse și directe specifice pentru gena de control ABL, plus o sondă FAM-TAMRA specifică.

† Amestec de soluții de amorsare inverse și directe specifice pentru gena de fuziune BCR-ABL mbc, plus o sondă FAM-TAMRA specifică.

Notă: Centrifugați pentru scurt timp diluțiile standard și amestecurile de soluții de amorsare și sonde înainte de utilizare.

Materiale necesare, dar nefurnizate

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, consultați fișele cu date de siguranță (Safety Data Sheet, SDS) corespunzătoare, disponibile de la furnizorul produsului.

Reactivi

- Apă de calitate PCR fără nuclează
- Reactivi pentru revers-transcriere: Reactivul validat este Superscript® II (sau Superscript) Reverse Transcriptase, include 5x first-strand buffer, 100 mM DTT (Life Technologies, nr. cat. 18064-022)
- Inhibitor de RNază: Reactivul validat este RNaseOUT™ (Life Technologies, nr. cat. 10777-019)
- Set de dNTPs, calitate PCR
- Hexamer aleatoriu
- MgCl₂
- Soluție tampon și Taq ADN-polimerază: Reactivii validați sunt TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, nr. cat. 4304437) și LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, nr. cat. 04535286001)

Consumabile

- Vârfuri de pipetă PCR sterile, fără nuclează, rezistente la aerosoli, cu filtre hidrofobe
- Tuburi PCR fără RNază și DNază de 0,5 sau 0,2 ml
- Gheață

Echipamente

- Micropipetă* dedicată pentru PCR (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)
- Centrifugă de banc* cu rotor pentru eprubete de reacție de 0,2 ml/0,5 ml (capabile să atingă 10.000 rot/min)
- Instrument pentru real-time PCR:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM sau alt instrument Rotor-Gene; LightCycler 1.2, 2.0 sau 480; ABI PRISM 7000, 7700 sau 7900HT SDS sau instrument SmartCycler și materiale specifice asociate
- Termociclor* sau baie de apă* (etapa de transcriere inversă)

* Asigurați-vă că instrumentele au fost verificate și calibrate în conformitate cu recomandările producătorului.

Reactivi complementari

- *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Controls Kit (nr. cat. 670091), format din linii celulare cu expresie negativă, puternic și slab pozitivă a genei de fuziune BCR-ABL mbc pentru validarea calitativă a extracției ARN și a transcrierii inverse

Avertismente și precauții

A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheet, SDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online într-un format PDF ușor de utilizat și compact, la adresa www.qiagen.com/safety, unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișa cu date de securitate (Safety Data Sheet, SDS) a fiecărui kit și componente a kitului QIAGEN.

Aruncați deșeurile de probe și de test în conformitate cu reglementările locale de siguranță.

Precauții generale

Testările qPCR necesită bune practici de laborator, inclusiv întreținerea echipamentelor, care sunt dedicate biologiei moleculare și conforme cu reglementările aplicabile și standardele relevante.

Acest kit este destinat diagnosticării in vitro. Reactivii și instrucțiunile furnizate în acest kit au fost validate pentru performanțe optime. Diluarea ulterioară a reactivilor sau modificarea timpilor și temperaturilor de incubare poate genera date eronate sau discordante. Reactivii PPC și PPF se pot modifica dacă sunt expuși la lumină. Toți reactivii sunt formulați în mod special pentru utilizare cu această testare. Pentru o performanță optimă a testării, nu trebuie făcute înlocuiri.

Determinarea nivelurilor de transcripții folosind qPCR necesită atât transcrierea inversă a ARNm, cât și amplificarea ADN-ului complementar generat prin PCR. Prin urmare, întreaga procedură a testului trebuie efectuată în condiții fără RNază/DNază.

Acordați o atenție extremă, pentru a preveni următoarele situații:

- Contaminarea cu RNază/DNază, care ar putea provoca degradarea ARNm-ului șablon și a ADN-ului complementar generat
- Contaminarea prin transfer de ARNm sau PCR, care are ca rezultat un semnal fals pozitiv

Prin urmare, recomandăm următoarele:

- Folosiți aparatură de laborator fără nuclează (de exemplu, pipete, vârfuri de pipetă, flacoane de reacție) și purtați mănuși când efectuați testul.

- Utilizați vârfuri de pipetă noi, rezistente la aerosoli, pentru toate etapele de pipetare pentru a evita contaminarea încrucișată a probelor și a reactivilor.
- Pregătiți amestecul Master Mix pre-PCR cu material dedicat (pipete, vârfuri etc.) într-o zonă dedicată, în care nu sunt introduse matrice ADN (ADN complementar, ADN, plasmidă). Adăugați șablonul într-o zonă separată (de preferință, într-o cameră separată) cu material specific (pipete, vârfuri etc.).
- Manipulați diluțiile standard (C1-3 și F1-5) într-o cameră separată.

Depozitarea și manipularea reactivilor

Kiturile sunt expediate pe gheață carbonică și trebuie depozitate între -30 și -15 °C la primire.

- Reduceți la minimum expunerea la lumină a amestecurilor de soluții de amorsare și sonde (tuburi PPC și PPF).
- Amestecați ușor și centrifugați tuburile înainte de deschidere.
- Depozitați toate componentele kitului în recipientele originale.

Aceste condiții de depozitare se aplică atât componentelor desfăcute, cât și celor nedesfăcute. Componentele depozitate în alte condiții decât cele menționate pe etichete pot să nu funcționeze corespunzător și pot afecta negativ rezultatele testului.

Datele de expirare pentru fiecare reactiv sunt indicate pe etichetele componentelor individuale. În condiții de depozitare corecte, produsul își va menține performanța până la data de expirare imprimată pe etichetă.

Nu există semne evidente care să indice instabilitatea acestui produs. Cu toate acestea, substanțele de control pozitive și cele negative trebuie rulate simultan cu eșantioane necunoscute.

Procedură

Prepararea ARN-ului pentru probă

Prepararea ARN-ului din probe de la pacienți (sânge sau măduvă osoasă) trebuie să fi fost efectuată cu o procedură validată. Calitatea testului depinde în mare măsură de calitatea ARN-ului de intrare. Prin urmare, recomandăm calificarea ARN-ului purificat prin electroforeză în gel de* agaroză sau prin utilizarea Agilent® Bioanalyzer® înainte de analiză.

Protocol: Transcriere inversă EAC standardizată recomandată

Operațiuni care trebuie executate înainte de începere

- Preparați dNTPs, câte 10 mM. Depozitați la $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ în părți alicote.

Procedură

1. Decongelați toate componentele necesare și așezați-le pe gheață.
2. Incubați 1 μg de ARN (1-4 μl) timp de 10 minute la $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ și răciți imediat pe gheață timp de 5 minute.
3. Centrifugați pentru scurt timp (aproximativ 10 secunde, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului). Apoi păstrați-le pe gheață.
4. Preparați următorul amestec RT în funcție de numărul de probe procesate (Tabelul 1).

* Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate.

Tabelul 1. Prepararea amestecului RT

Componentă	Volum per probă (µl)	Concentrație finală
First-Strand Buffer (furnizat împreună cu Superscript II Reverse Transcriptase), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTPs (câte 10 mM, de preparat în prealabil și de depozitat la -20 °C în părți alicote)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, furnizat împreună cu Superscript II Reverse Transcriptase)	2,0	10 mM
Inhibitor de RNază (40 U/µl)	0,5	1 U/µl
Hexamer aleatoriu (100 µM)	5,0	25 µM
Superscript II sau Superscript Reverse Transcriptase (200 U/µl)	0,5	5 U/µl
Probă ARN încălzită (de adăugat la pasul 5)	1,0-4,0	50 ng/µl
Apă de calitate PCR fără nuclează (de adăugat la pasul 5)	0,0-3,0	–
Volum final	20,0	–

- 5. Pipetați câte 16 µl de amestec RT în fiecare eprubetă PCR. Apoi adăugați 1-4 µl (1 µg) ARN (de la pasul 3) și ajustați volumul la 20 µl cu apă de calitate PCR fără nuclează (consultați Tabelul 2).**

Tabelul 2. Prepararea reacției de transcriere inversă

Componentă	Volum (µl)
Amestec RT	16
Probă ARN încălzită (1 µg)	1-4
Apă de calitate PCR fără nuclează	0-3
Volum final	20

6. Amestecați bine și centrifugați pentru scurt timp (aproximativ 10 secunde, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului).
7. Incubați la 20 °C timp de 10 minute.
8. Incubați la 42 °C pe un termociclator timp de 45 de minute, apoi imediat la 99 °C timp de 3 minute.
9. Răciți pe gheață (pentru a opri reacția) timp de 5 minute.
10. Centrifugați pentru scurt timp (aproximativ 10 secunde, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului). Apoi păstrați-le pe gheață.
11. Diluați ADN-ul complementar final cu 30 μl de apă de calitate PCR fără nuclează, astfel încât volumul final să fie de 50 μl.
12. Efectuați PCR în conformitate cu următoarele protocoale, conform instrumentului dumneavoastră qPCR.

Protocol: qPCR pe instrumente Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM sau Rotor-Gene Q 5plex HRM cu rotor cu 72 de tuburi

Dacă utilizați acest instrument, vă recomandăm să efectuați toate măsurătorile în duplicat, așa cum este indicat în Tabelul 3.

Tabelul 3. Număr de reacții pentru instrumentele Rotor-Gene Q cu rotor cu 72 de tuburi

Probele	Reacții
Cu amestecul de soluții de amorsare și sonde ABL (PPC-ABL)	
n probe de ADN complementar	n x 2 reacții
Standard ABL	2 x 3 reacții (3 diluții, fiecare testată în duplicat)
Substanță de control apă	2 reacții
Cu amestecul de soluții de amorsare și sonde BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)	
n probe de ADN complementar	n x 2 reacții
Standard mbcr	2 x 5 reacții (5 diluții, fiecare testată în duplicat)
Substanță de control apă	2 reacții

Procesarea probelor pe instrumente Rotor-Gene Q cu rotor cu 72 de tuburi

Vă recomandăm să testați cel puțin 8 probe de ADN complementar în același experiment pentru a optimiza utilizarea standardelor și a amestecurilor de soluții de amorsare și sonde.

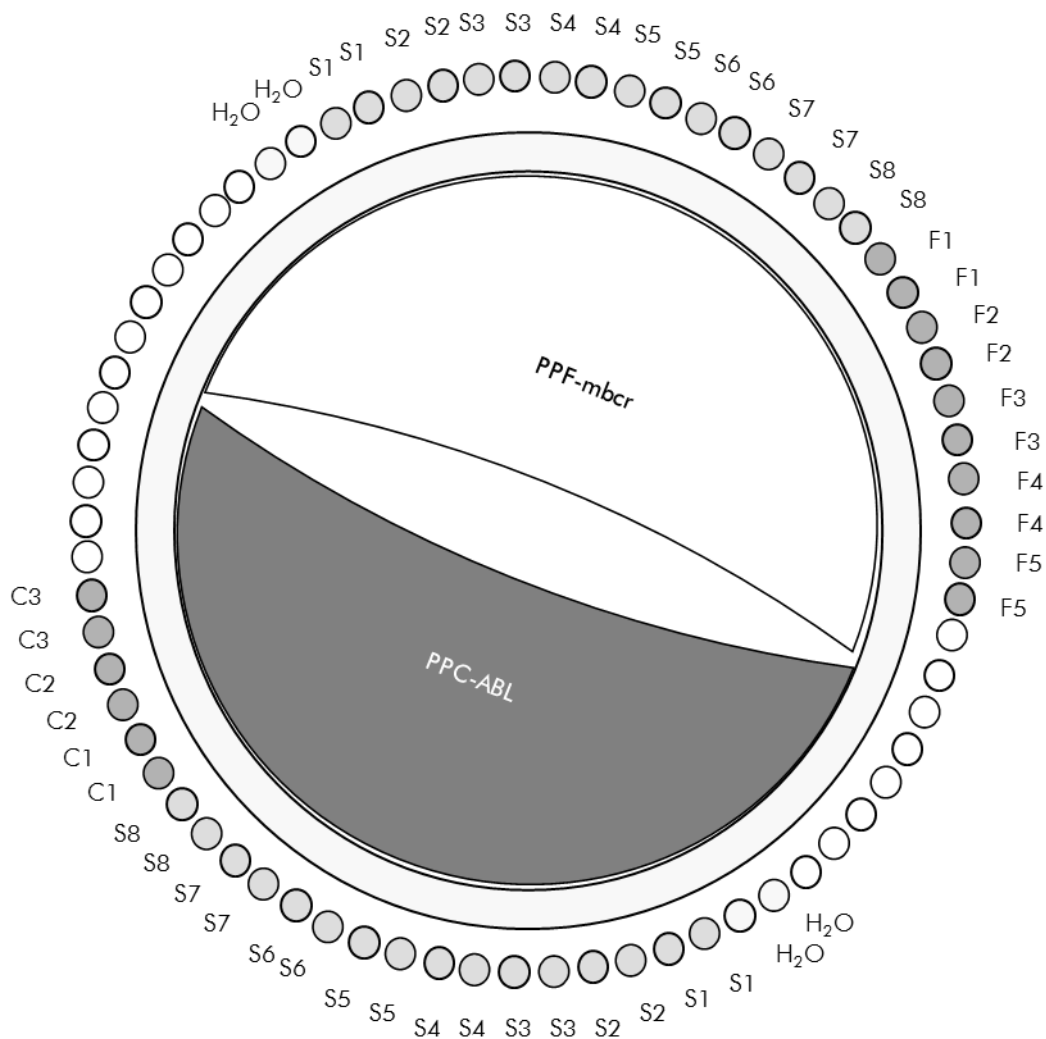


Figura 3. Configurarea sugerată a rotorului pentru fiecare experiment efectuat cu *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Kit. F1-5: Standarde BCR-ABL mbcr; C1-3: Standarde ABL; S: probă de ADN complementar; H₂O: substanță de control apă.

Notă: Aveți grijă să plasați întotdeauna o probă de testat în poziția 1 a rotorului. În caz contrar, în timpul etapei de calibrare, instrumentul nu va efectua calibrarea și vor fi obținute date de fluorescență incorecte.

Umpleți toate celelalte poziții cu tuburi goale.

qPCR pe instrumente Rotor-Gene Q cu rotor cu 72 de tuburi

Notă: Toate etapele vor fi efectuate pe gheață.

Procedură

1. Decongețați toate componentele necesare și așezați-le pe gheață.
2. Preparați următorul amestec qPCR în funcție de numărul de probe procesate.

Toate concentrațiile se referă la volumul final al reacției.

Tabelul 4 descrie schema de pipetare pentru prepararea unui amestec de reactivi, calculată pentru a obține un volum final de reacție de 25 μ l. Poate fi preparat un amestec preliminar, în funcție de numărul de reacții, folosind același amestec de soluții de amorsare și sonde (PPC-ABL sau PPF-mbcr). Sunt incluse volume suplimentare pentru a compensa eroarea de pipetare.

Tabelul 4. Prepararea amestecului qPCR

Componentă	1 reacție (μl)	ABL: 24+1 reacții (μl)	BCR-ABL mbcr: 28+1 reacții (μl)	Concentrație finală
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Amestec de soluții de amorsare și sonde, 25x	1	25	29	1x
Apă de calitate PCR fără nuclează	6,5	162,5	188,5	–
Probă (de adăugat la pasul 4)	5	Câte 5	Câte 5	–
Volum total	25	Câte 25	Câte 25	–

3. Distribuți 20 μ l de amestec qPCR preliminar per tub.
4. Adăugați 5 μ l de produs RT (ADN complementar, 100 ng echivalent ARN) obținut în transcrierea inversă (consultați „Protocol: Transcriere inversă EAC standardizată recomandată”, pagina 11) în tubul corespunzător (volum total 25 μ l).
5. Amestecați ușor, prin pipetare pe verticală.
6. Așezați tuburile în termociclor, conform recomandărilor producătorului.
7. Programați instrumentul Rotor-Gene Q cu programul de termociclare, așa cum este indicat în Tabelul 5.

Tabelul 5. Profilul de temperatură

Modul de analiză	Cuantificarea
Hold (Reținere)	Temperature (Temperatură): 50 de grade Time (Timp): 2 minute
Hold 2 (Reținere 2)	Temperature (Temperatură): 95 de grade Time (Timp): 10 minute
Cycling (Repetare ciclu)	50 times (50 de ori) 95 de grade timp de 15 secunde 60 de grade timp de 1 minut cu achiziție de fluorescență FAM pe canalul Green: Unic

8. Pentru instrumentele Rotor-Gene Q, selectați „Slope Correct” (Corecție pantă) pentru analiză. Vă recomandăm să setați pragul la 0,03. Porniți programul de termociclare, așa cum este indicat în Tabelul 5.

Protocol: qPCR pe instrumentul ABI PRISM 7000, 7700 și 7900HT SDS și pe instrumentul LightCycler 480

Dacă utilizați echipament qPCR cu plăci cu 96 de godeuri, vă recomandăm să efectuați toate măsurătorile în duplicat, așa cum este indicat în Tabelul 6.

Tabelul 6. Număr de reacții folosind echipament qPCR cu plăci cu 96 de godeuri

Probele	Reacții
Cu amestecul de soluții de amorsare și sonde ABL (PPC-ABL)	
n probe de ADN complementar	n x 2 reacții
Standard ABL	2 x 3 reacții (3 diluții, fiecare testată în duplicat)
Substanță de control apă	2 reacții
Cu amestecul de soluții de amorsare și sonde BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)	
n probe de ADN complementar	n x 2 reacții
Standard mbcr	2 x 5 reacții (5 diluții, fiecare testată în duplicat)
Substanță de control apă	2 reacții

Procesarea probelor pe instrumentul ABI PRISM 7000, 7700 și 7900 SDS și pe instrumentul LightCycler 480

Vă recomandăm să testați cel puțin 8 probe de ADN complementar în același experiment pentru a optimiza utilizarea standardelor și a amestecurilor de soluții de amorsare și sonde. Schema plăcilor din Figura 4 prezintă un astfel de experiment exemplificativ.

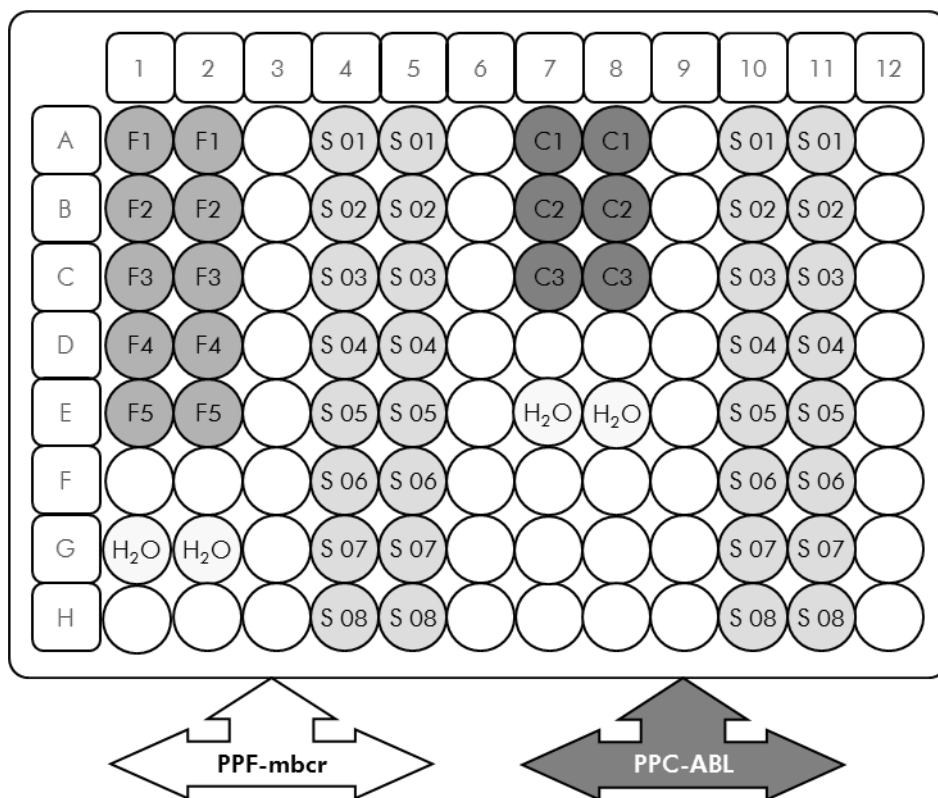


Figura 4. Configurarea sugerată a plăcilor pentru un experiment. S: probă de ADN complementar; F1-5: Standarde BCR-ABL mbcr; C1-3: Standarde ABL; H₂O: substanță de control apă.

qPCR pe instrumentul ABI PRISM 7000, 7700 și 7900 SDS și pe instrumentul LightCycler 480

Notă: Toate etapele vor fi efectuate pe gheață.

Procedură

1. Decongețați toate componentele necesare și așezați-le pe gheață.
2. Preparați următorul amestec qPCR în funcție de numărul de probe procesate. Dacă utilizați echipament qPCR cu plăci cu 96 de godeuri, vă recomandăm să efectuați toate măsurătorile în duplicat.

Toate concentrațiile se referă la volumul final al reacției.

Tabelul 7 descrie schema de pipetare pentru prepararea unui amestec de reactivi, calculată pentru a obține un volum final de reacție de 25 μl. Poate fi preparat un amestec preliminar, în funcție de numărul de reacții, folosind același amestec de soluții de amorsare și sonde (PPC-ABL sau PPF-mbcr). Sunt incluse volume suplimentare pentru a compensa eroarea de pipetare.

Tabelul 7. Prepararea amestecului qPCR

Componentă	1 reacție (μl)	ABL: 24+1 reacții (μl)	BCR-ABL mbc: 28+1 reacții (μl)	Concentrație finală
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Amestec de soluții de amorsare și sonde, 25x	1	25	29	1x
Apă de calitate PCR fără nuclează	6,5	162,5	188,5	–
Probă (de adăugat la pasul 4)	5	Câte 5	Câte 5	–
Volum total	25	Câte 25	Câte 25	–

3. Distribuți 20 μl de amestec qPCR preliminar per godeu.
4. Adăugați 5 μl de produs RT (ADN complementar, 100 ng echivalent ARN) obținut în transcrierea inversă (consultați „Protocol: Transcriere inversă EAC standardizată recomandată”, pagina 11) în godeul corespunzător (volum total 25 μl).
5. Amestecați ușor, prin pipetare pe verticală.
6. Închideți placa și centrifugați pentru scurt timp (300 x g, aproximativ 10 secunde).
7. Așezați placa în termociclor, conform recomandărilor producătorului. Programați termociclorul la programul de termociclare, așa cum este indicat în Tabelul 8 pentru instrumentul ABI PRISM 7000, 7700 și 7900HT SDS sau Tabelul 9 pentru instrumentul LightCycler 480.

Tabelul 8. Profilul temperaturii pentru ABI PRISM 7000, 7700 și 7900HT SDS

Modul de analiză	Curba standard – Cuantificare absolută
Hold (Reținere)	Temperature (Temperatură): 50 °C Time (Timp): 2 minute
Hold 2 (Reținere 2)	Temperature (Temperatură): 95 °C Time (Timp): 10 minute
Cycling (Repetare ciclu)	50 times (50 de ori) 95 °C timp de 15 secunde 60 °C timp de 1 minut cu achiziția fluorescenței FAM; substanță extincătoare de fluorescență: TAMRA

Tabelul 9. Profilul temperaturii pentru instrumentul LightCycler 480

Modul de analiză	Cuantificare absolută („Abs Quant”)
Formate de detecție	Selectați „Simple Probe” (Sondă simplă) în fereastra Detection formats (Formate de detecție)
Hold (Reținere)	Temperature (Temperatură): 50 °C Time (Timp): 2 minute
Hold 2 (Reținere 2)	Temperature (Temperatură): 95 °C Time (Timp): 10 minute
Cycling (Repetare ciclu)	50 times (50 de ori) 95 °C timp de 15 secunde 60 °C timp de 1 minut cu achiziția fluorescenței FAM corespunzătoare intervalului (483-533 nm) pentru LC versiunea 01 și (465-510 nm) pentru LC versiunea 02

8. Pentru ABI PRISM 7000, 7700 și 7900HT SDS, parcurgeți etapa 8a. Pentru instrumentul LightCycler 480, parcurgeți etapa 8b.
- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 și 7900HT SDS: Vă recomandăm un prag setat la 0,1 așa cum este descris în protocolul EAC în etapa de analiză pe ABI PRISM SDS și o linie de bază setată între ciclurile 3 și 15. Porniți programul de ciclare, așa cum este indicat în Tabelul 8.

8b. Instrumentul LightCycler 480: Vă recomandăm un mod de analiză de tip Fit point cu fundal la 2,0 și prag la 2,0. Porniți programul de termociclare, așa cum este indicat în Tabelul 9.

Protocol: qPCR pe instrumente LightCycler 1.2 și 2.0

Dacă utilizați instrumente cu capilare, recomandăm măsurarea probelor în duplicat și a substanțelor de control o singură dată, așa cum este indicat în Tabelul 10.

Tabelul 10. Număr de reacții pentru instrumentele LightCycler 1.2 și 2.0

Probele	Reacții
Cu amestecul de soluții de amorsare și sonde ABL (PPC-ABL)	
n probe de ADN complementar	n x 2 reacții
Standard ABL	1 x 3 reacții (3 diluții standard, fiecare testată o singură dată)
Substanță de control apă	1 reacție
Cu amestecul de soluții de amorsare și sonde BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)	
n probe de ADN complementar	n x 2 reacții
Standard mbcr	1 x 5 reacții (5 diluții standard, fiecare testată o singură dată)
Substanță de control apă	1 reacție

Procesarea probelor pe instrumentele LightCycler 1.2 și 2.0

Vă recomandăm să testați cel puțin 5 probe de ADN complementar în același experiment pentru a optimiza utilizarea standardelor și a amestecurilor de soluții de amorsare și sonde. Schema capilarelor din Figura 5 prezintă un experiment exemplificativ.

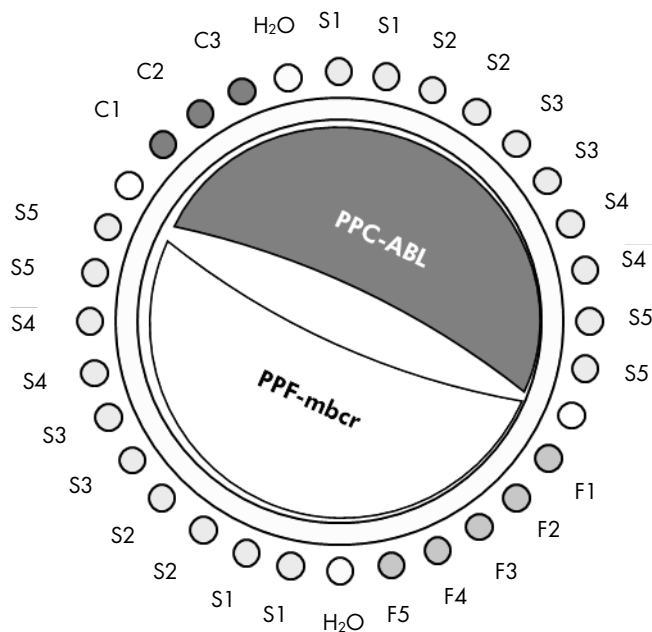


Figura 5. Configurarea sugerată a rotorului pentru fiecare experiment efectuat cu *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Kit. F1-5: Standarde BCR-ABL mbcr; C1-3: Standarde ABL; S: probă de ADN necunoscută de analizat; H₂O: substanță de control apă.

qPCR pe instrumentele LightCycler 1.2 și 2.0

Notă: Din cauza cerințelor tehnologice speciale, experimentele cu LightCycler trebuie efectuate folosind reactivi specifici. Vă recomandăm să utilizați LightCycler TaqMan Master și să urmați instrucțiunile producătorului pentru prepararea amestecului Master Mix 5x.

Notă: Toate etapele vor fi efectuate pe gheață.

Procedură

- 1. Decongețați toate componentele necesare și așezați-le pe gheață.**
- 2. Preparați următorul amestec qPCR în funcție de numărul de probe procesate.**

Toate concentrațiile se referă la volumul final al reacției.

Tabelul 11 descrie schema de pipetare pentru prepararea unui amestec de reactivi, calculată pentru a obține un volum final de reacție de 20 μl. Poate fi preparat un amestec preliminar, în funcție de numărul de reacții, folosind aceleași soluții de amorsare și sonde (PPC-ABL sau PPF-mbcr). Sunt incluse volume suplimentare pentru a compensa eroarea de pipetare.

Tabelul 11. Prepararea amestecului qPCR

Componentă	1 reacție (μl)	ABL: 14+1 reacții (μl)	BCR-ABL mbc: 16+1 reacții (μl)	Concentrație finală
LightCycler TaqMan Master Mix, 5x proaspăt preparat	4,0	60	68,0	1x
Amestec de soluții de amorsare și sonde, 25x	0,8	12	13,6	1x
Apă de calitate PCR fără nuclează	10,2	153	173,4	–
Probă (de adăugat la pasul 4)	5,0	Câte 5	Câte 5,0	–
Volum total	20,0	Câte 20	Câte 20,0	–

- 3. Distribuți 15 μl de amestec qPCR preliminar per capilar.**
- 4. Adăugați 5 μl de produs RT (ADN complementar, 100 ng echivalent ARN) obținut în transcrierea inversă (consultați „Protocol: Transcriere inversă EAC standardizată recomandată”, pagina 11) în tubul corespunzător (volum total 20 μl).**
- 5. Amestecați ușor, prin pipetare pe verticală.**
- 6. Așezați capilarele în adaptoarele furnizate împreună cu aparatul și centrifugați pentru scurt timp (700 x g, aproximativ 10 secunde).**
- 7. Încărcați capilarele termociclor, conform recomandărilor producătorului.**
- 8. Programați instrumentul LightCycler 1.2 sau 2.0 la programul de termociclare, așa cum este indicat în Tabelul 12.**

Tabelul 12. Profilul de temperatură

Modul de analiză	Cuantificare
Hold (Reținere)	Temperature (Temperatură): 95 °C Time (Timp): 10 minute Rampă: 20
Cycling (Repetare ciclu)	50 times (50 de ori) 95 °C timp de 10 secunde; rampă: 20 60 °C timp de 1 minut; rampă: 20; cu achiziția fluorescenței FAM: Unic
Hold 2 (Reținere 2)	45 °C timp de 1 minut; rampă: 20

9. Pentru LightCycler 1.2, parcurgeți etapa 9a. Pentru LightCycler 2.0, parcurgeți etapa 9b.
- 9a. LightCycler 1.2: Se recomandă F1/F2 și modul „2nd derivative analysis” (analiză cu derivată secundară). Porniți programul de termociclare, așa cum este indicat în Tabelul 12.
- 9b. LightCycler 2.0: Vă recomandăm să utilizați analiza automată (F''max) pe LightCycler 2.0 Software versiunea 4.0 pentru a obține rezultate reproductibile. Porniți programul de termociclare, așa cum este indicat în Tabelul 12.

Protocol: qPCR pe instrumentul SmartCycler

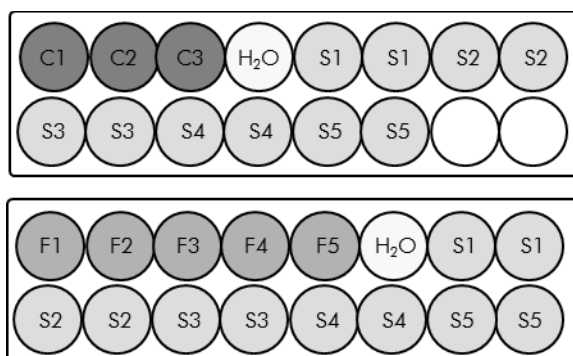
Dacă utilizați acest instrument, recomandăm măsurarea probelor în duplicat și a substanțelor de control o singură dată, așa cum este indicat în Tabelul 13.

Tabelul 13. Număr de reacții pentru instrumentul SmartCycler

Probele	Reacții
Cu amestecul de soluții de amorsare și sonde ABL (PPC-ABL)	
n probe de ADN complementar	n x 2 reacții
Standard ABL	1 x 3 reacții (3 diluții standard, fiecare testată o singură dată)
Substanță de control apă	1 reacție
Cu amestecul de soluții de amorsare și sonde BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)	
n probe de ADN complementar	n x 2 reacții
Standard mbcr	1 x 5 reacții (5 diluții standard, fiecare testată o singură dată)
Substanță de control apă	1 reacție

Procesarea probelor pe instrumentul SmartCycler

Vă recomandăm să testați cel puțin 5 probe de ADN complementar în același experiment pentru a optimiza utilizarea standardelor și a amestecurilor de soluții de amorsare și sonde. Schema celor două blocuri din Figura 6 prezintă un exemplu.



Toate testele din acest prim bloc sunt efectuate cu PPC-ABL

Toate testele din acest al doilea bloc sunt efectuate cu PPF-mbcr.

Figura 6. Configurarea sugerată a plăcilor pentru un experiment. S: probă de ADN complementar; **F1-5:** Standarde BCR-ABL mbcr; **C1-3:** Standarde ABL; **H₂O:** substanță de control apă.

qPCR pe instrumentul SmartCycler

Notă: Toate etapele vor fi efectuate pe gheață.

Procedură

1. Decongeleți toate componentele necesare și așezați-le pe gheață.
2. Preparați următorul amestec qPCR în funcție de numărul de probe procesate.

Toate concentrațiile se referă la volumul final al reacției.

Tabelul 14 descrie schema de pipetare pentru prepararea unui amestec de reactivi, calculată pentru a obține un volum final de reacție de 25 μ l. Poate fi preparat un amestec preliminar, în funcție de numărul de reacții, folosind același amestec de soluții de amorsare și sonde (PPC-ABL sau PPF-mbcr). Sunt incluse volume suplimentare pentru a compensa eroarea de pipetare.

Tabelul 14. Prepararea amestecului qPCR

Componentă	1 reacție (μ l)	ABL: 14+1 reacții (μ l)	BCR-ABL mbcr: 16+1 reacții (μ l)	Concentrație finală
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Amestec de soluții de amorsare și sonde, 25x	1	15	17	1x
Apă de calitate PCR fără nuclează	6,5	97,5	110,5	–
Probă (de adăugat la pasul 4)	5	Câte 5	Câte 5	–
Volum total	25	Câte 25	Câte 25	–

3. Distribuți 20 μ l de amestec qPCR preliminar per godeu.
4. Adăugați 5 μ l de produs RT (ADN complementar, 100 ng echivalent ARN) obținut în transcrierea inversă (consultați „Protocol: Transcriere inversă EAC standardizată recomandată”, pagina 11) în tubul corespunzător (volum total 25 μ l).
5. Amestecați ușor, prin pipetare pe verticală.
6. Încărcați probele în termociclor, conform recomandărilor producătorului.

7. Programați instrumentul SmartCycler cu programul de termociclare indicat în Tabelul 15.

Tabelul 15. Profilul de temperatură

Hold (Reținere)	Temperature (Temperatură): 50 °C Time (Timp): 2 minute
Hold 2 (Reținere 2)	Temperature (Temperatură): 95 °C Time (Timp): 10 minute
Cycling (Repetare ciclu)	50 times (50 de ori) 95 °C timp de 15 secunde 60 °C timp de 1 minut cu achiziție: Unic

8. Vă recomandăm un prag setat la 30. Porniți programul de termociclare, așa cum este indicat în Tabelul 15.

Interpretarea rezultatelor

Principiul analizei datelor

Dacă utilizați tehnologia TaqMan, numărul de cicluri PCR necesare pentru a detecta un semnal peste prag se numește ciclu de prag (C_T) și este direct proporțional cu cantitatea de țintă prezentă la începutul reacției.

Dacă utilizați standarde cu un număr cunoscut de molecule, se poate stabili o curbă standard și se poate determina cantitatea exactă de țintă prezentă în proba de testare. Curbele standard *ipsogen* sunt bazate pe plasmide; folosim 3 diluții standard de plasmide pentru CG și 5 diluții standard pentru FG, pentru a asigura curbe standard de precizie. Figurile 7 și 8 prezintă un exemplu de curbe de amplificare TaqMan, obținute cu *ipsogen* BCR-ABL mbcR-ABL Kit.

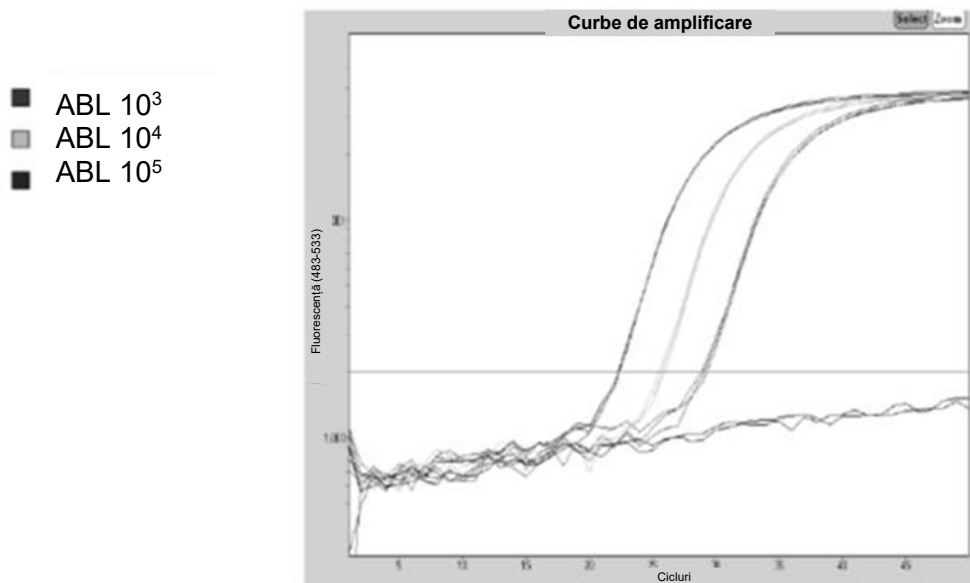


Figura 7. Detectia standardelor ABL (C1, C2, C3). 10³, 10⁴ și 10⁵ copii/5 μl.

- m-bcr 10^1
- m-bcr 10^2
- m-bcr 10^3
- m-bcr 10^5
- m-bcr 10^6

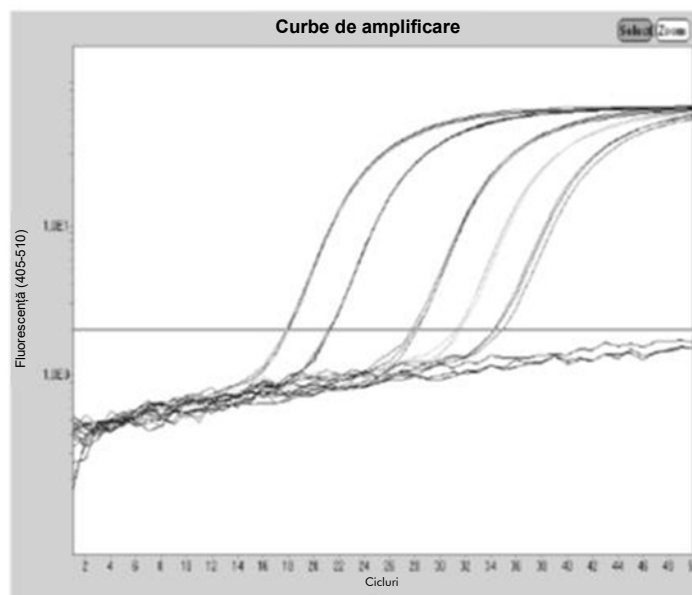


Figura 8. Detecția standardelor BCR-ABL mbc (F1-F5). 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 copii/5 μ l.

Rezultate

Curba standard și criteriile de control al calității

Datele brute pot fi lipite într-un fișier Excel® pentru analiză.

Pentru fiecare genă (ABL și BCR-ABL), valorile brute C_T obținute din diluțiile standard de plasmide sunt reprezentate grafic în funcție de numărul de copii logaritmice (3, 4 și 5 pentru C1, C2 și C3; 1, 2, 3, 5 și 6 pentru F1, F2, F3, F4 și F5). Figura 9 prezintă un exemplu de curbă teoretică calculată pe 5 diluții standard.

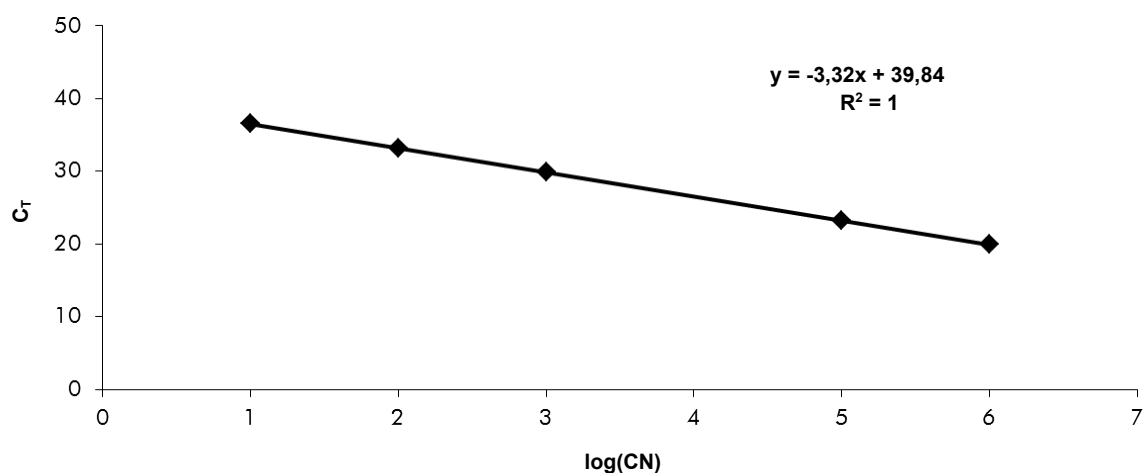


Figura 9. Curba teoretică calculată din cele 5 diluții standard. Se calculează o curbă de regresie liniară ($y = ax + b$) pentru fiecare genă (ABL și BCR-ABL), unde a este panta dreptei și b este intersecția în y , care este coordonata y a punctului în care linia intersectează axa y . Ecuația și coeficientul de determinare (R^2) sunt imprimate pe grafic.

Deoarece standardele sunt diluții 10x, panta teoretică a curbei este $-3,3$. O pantă între $-3,0$ și $-3,9$ este acceptabilă atât timp cât R^2 este $>0,95$ (2). Cu toate acestea, pentru rezultate de precizie se recomandă o valoare pentru $R^2 >0,98$ (3).

Numărul de copii normalizat (Normalized Copy Number, NCN)

Ecuația curbei standard ABL trebuie utilizată pentru a transforma valorile brute C_T (obținute cu PPC-ABL) pentru probele necunoscute în numere de copii ABL (ABL_{CN}).

Ecuația curbei standard BCR-ABL trebuie utilizată pentru a transforma valorile brute C_T (obținute cu PPF-mbcr) pentru probele necunoscute în numere de copii BCR-ABL ($BCR-ABL_{mbcr_{CN}}$).

Raportul dintre aceste valori CN oferă numărul de copii normalizate (Normalized Copy Number, NCN):

$$NCN = \frac{BCR-ABL_{mbcr_{CN}}}{ABL_{CN}} \times 100$$

Valoare MRD

Valoarea bolii reziduale minime (Minimal Residual Disease, MRD) este raportul dintre expresia normalizată CG a FG în probele de monitorizare ($(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$) și probele de diagnosticare ($(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$).

$$\text{Valoarea MRD (MRDv)} = \frac{(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}}{(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}}$$

Sensibilitate

Sensibilitatea (SENS_v) este calculată în conformitate cu expresia relativă a FG în proba de diagnosticare (FG_{CN}/CG_{CN})_{DX} și expresia CG (CG_{CN,FUP}) în proba de monitorizare.

$$\text{Sensibilitate (SENS}_v\text{)} = \frac{CG_{CN,DX}}{CG_{CN,FUP} \times FG_{CN,DX}}$$

Controlul calității pentru valorile ABL

Calitatea slabă a ARN-ului sau problemele în timpul etapelor qPCR au ca rezultat o valoare ABL_{CN} scăzută. Vă recomandăm să eliminați rezultatele de la probele care au ABL_{CN} <1318 (valoarea mai mică a Î 95 % din probele de la pacienți în studiul EAC, referința 4).

Reproductibilitatea între replicate

Variația valorilor C_T între replicate trebuie să fie <2, corespunzătoare unei modificări 4x a valorilor numărului de copii.

Variația valorilor C_T între replicate este în general <1,5, dacă valoarea medie C_T a replicatelor este <36 (2).

Notă: Fiecare utilizator trebuie să măsoare propria reproductibilitate în laboratorul său.

Substanțe de control cu apă

Substanțele de control negative trebuie să genereze un CN zero.

O substanță de control cu apă pozitivă este cauzată de o contaminare încrucișată. Consultați „Ghid de depanare” de mai jos pentru a găsi o soluție.

Ghid de depanare

Acest ghid de depanare poate fi util în rezolvarea oricăror probleme care pot apărea. Pentru informații suplimentare, a se vedea și pagina „Întrebări frecvente” din cadrul Centrului nostru pentru Asistență Tehnică: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Cercetătorii din cadrul Serviciilor tehnice QIAGEN vă stau întotdeauna la dispoziție pentru a răspunde la orice întrebări pe care le aveți despre informațiile și protocolul din acest manual, precum și despre tehnologiile de prelevare și testare (pentru datele de contact, consultați „Date de contact”, pagina 44).

Comentarii și sugestii

Rezultat negativ pentru gena de control (ABL) și BCR-ABL mbcR în toate probele – standard ok

- a) Calitate slabă a ARN-ului
- Verificați întotdeauna calitatea și concentrația ARN-ului înainte de a începe.
- Rulați în paralel o substanță de control pozitivă la ARN din linie celulară (substanță de control puternic pozitivă în *ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Controls Kit, nr. cat. 670091).
- b) Eșec în etapa de transcriere inversă
- Verificați întotdeauna calitatea și concentrația ARN-ului înainte de a începe.
- Rulați în paralel o substanță de control pozitivă la ARN din linie celulară (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Controls Kit, nr. cat. 670091).

Rezultat negativ pentru gena de control (ABL) în probe – standard ok

- a) Calitate slabă a ARN-ului
- Verificați întotdeauna calitatea și concentrația ARN-ului înainte de a începe.
- Rulați în paralel o substanță de control pozitivă la ARN din linie celulară (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Controls Kit, nr. cat. 670091).
- b) Eșec în etapa de transcriere inversă
- Verificați întotdeauna calitatea și concentrația ARN-ului înainte de a începe.
- Rulați în paralel o substanță de control pozitivă la ARN din linie celulară (*ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Controls Kit, nr. cat. 670091).

Semnal standard negativ

- a) Eroare la pipetare
- Verificați schema de pipetare și configurarea reacției.
- Repetăți testarea PCR.
- b) Depozitarea necorespunzătoare a componentelor kitului
- Depozitați *ipsogen* BCR-ABL1 mbcR Kit la temperaturi cuprinse între –15 și –30 °C și feriți de lumină amestecurile de soluții de amorsare și sonde (PPC și PPF). Consultați „Depozitarea și manipularea reactivilor”, pagina 10.
- Evitați ciclurile repetate de congelare și decongelare.
- Divizați reactivii în părți alicote pentru depozitare.

Comentarii și sugestii

Substanțele de control negative sunt pozitive

Contaminare încrucișată	Înlocuiți toți reactivii critici. Repetati experimentul cu noi părți alicote din toți reactivii. Manipulați întotdeauna probele, componentele kitului și consumabilele în conformitate cu practicile acceptate în mod obișnuit pentru a preveni contaminarea prin transfer.
-------------------------	---

Lipsa semnalului, chiar și în substanțele de control standard

a) Eroare la pipetare sau reactivi omiși	Verificați schema de pipetare și configurarea reacției. Repetati testarea PCR.
b) Efecte inhibitoare ale materialului de probă, cauzate de o purificare insuficientă	Repetati prepararea ARN-ului.
c) LightCycler: Canal de detecție ales greșit	Setați Channel Setting (Setare canal) la F1/F2 sau la 530 nm/640 nm.
d) LightCycler: Achiziția de date nu a fost programată	Verificați programele de ciclare. Selectați modul de achiziție „single” (unic) la sfârșitul fiecărui segment de temperare al programului PCR.

Semnal absent sau slab în probe, dar substanțele de control standard sunt în regulă

a) Calitate slabă sau concentrație scăzută a ARN-ului	Verificați întotdeauna calitatea și concentrația ARN-ului înainte de a începe. Rulați în paralel o substanță de control pozitivă la ARN din linie celulară (<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit, nr. cat. 670091).
b) Eșec în etapa de transcriere inversă	Verificați întotdeauna calitatea și concentrația ARN-ului înainte de a începe. Rulați în paralel o substanță de control pozitivă la ARN din linie celulară (<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit, nr. cat. 670091).

Comentarii și sugestii

Intensitatea fluorescenței este prea mică

- a) Depozitarea necorespunzătoare a componentelor kitului
Depozitați *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kit la temperaturi cuprinse între –15 și –30 °C și feriți de lumină amestecurile de soluții de amorsare și sonde (PPC și PPF). Consultați „Depozitarea și manipularea reactivilor”, pagina 10.
Evitați ciclurile repetate de congelare și decongelare.
Divizați reactivii în părți alicote pentru depozitare.
- b) Cantitate inițială foarte mică de ARN țintă
Măriți cantitatea de ARN din probă.
Notă: În funcție de metoda aleasă de preparare a ARN-ului, pot apărea efecte inhibitorii.

LightCycler: Intensitatea fluorescenței variază

- a) Eroare la pipetare
Variabilitatea cauzată de așa-numita „eroare la pipetare” poate fi redusă prin analiza datelor în modul F1/F2 sau 530 nm/640 nm.
- b) Centrifugare insuficientă a capilarelor
Amestecul PCR preparat se poate afla încă în vasul superior al capilarului sau o bulă de aer ar putea fi prinsă în vârful capilarului.
Întotdeauna centrifugați capilarele încărcate cu amestecul de reacție așa cum este descris în manualul de utilizare specific al aparatului.
- c) Suprafața exterioară a vârfului capilarului este murdară
Purtați întotdeauna mănuși la manipularea capilarelor.

LightCycler: Eroare curbă standard

- Eroare la pipetare
Variabilitatea cauzată de așa-numita „eroare la pipetare” poate fi redusă prin analiza datelor în modul F1/F2 sau 530 nm/640 nm.

Controlul calității

Controlul calității kitului complet a fost efectuat pe un instrument LightCycler 480. Acest kit este fabricat conform standardului ISO 13485:2003. Buletinele de analiză sunt disponibile la cerere, la adresa www.qiagen.com/support/.

Limitări

Utilizatorii trebuie să fie instruiți și familiarizați cu această tehnologie înainte de a utiliza acest dispozitiv.

Orice rezultate de diagnostic generate trebuie interpretate în coroborare cu alte rezultate clinice sau de laborator. Validarea performanței sistemului pentru orice proceduri utilizate în laborator care nu fac obiectul studiilor de performanță efectuate de QIAGEN constituie răspunderea utilizatorului.

Trebuie acordată atenție datelor de expirare tipărite pe cutia și pe etichetele tuturor componentelor. Nu utilizați componente expirate.

Notă: Kitul a fost conceput conform studiilor „Europe Against Cancer” (EAC) (4) și este în conformitate cu recomandările internaționale actualizate (3, 5). Acesta trebuie utilizat cu respectarea instrucțiunilor din acest manual, în combinație cu reactivi și instrumente validate (consultați „Materiale necesare, dar nefurnizate”, pagina 8). Orice utilizare care nu este conformă cu eticheta acestui produs și/sau modificarea componentelor vor anula răspunderea QIAGEN.

Caracteristici de performanță

Studii nonclinice

Materiale și metode

Evaluarea performanței a fost efectuată pe un ABI PRISM 7700 SDS, în combinație cu reactivii enumerați în „Materiale necesare, dar nefurnizate”, pagina 8. Studiile de echivalență au validat utilizarea pe următoarele instrumente: Instrumentele ABI PRISM 7000 și 7900HT SDS, LightCycler 1.2 și 480, Rotor-Gene 3000 și SmartCycler (6).

Au fost efectuate studii nonclinice pentru a stabili performanța analitică a *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Kit. Aceste studii nonclinice de laborator au fost efectuate pe ARN total din linia celulară TOM1, diluat într-o cantitate finală constantă de ARN total din linia celulară MV4-11.

Pentru a determina repetabilitatea testului, 5 concentrații diferite de ARN total TOM1 (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg și 0,5 pg) diluate în ARN total MV4-11, într-o cantitate totală finală constantă de 1000 ng, au fost analizate în 5 replicare per rulare și în 4 rulări diferite (Figura 10).

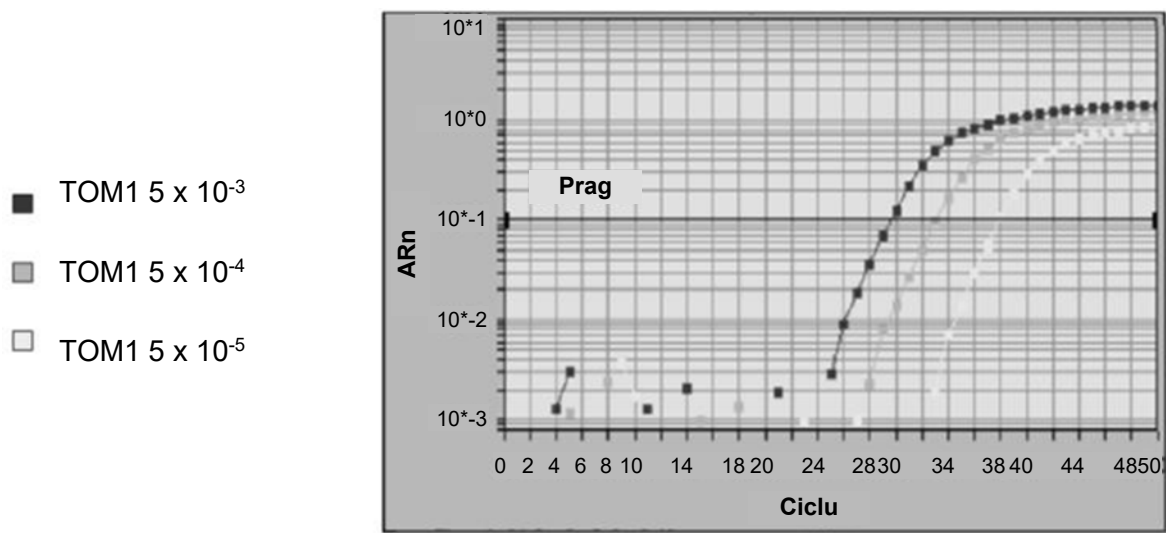


Figura 10. Reprezentări grafice ale amplificării pentru diluțiile 5×10^{-3} (5 ng), 5×10^{-4} (0,5 ng) și 5×10^{-5} (0,05 ng) ale ARN-ului total TOM1 în ARN total negativ la MV4-11.

Date analitice

Tabelele 16–19 prezintă analizele inter-teste cu ciclul de prag mediu (C_T), abaterea standard (Standard Deviation, SD), numărul de probe (n), coeficientul de variație (Coefficient of Variation, CV), numărul mediu de copii (Copy Number, CN) și numărul mediu de copii normalizat (Normalized Copy Number, NCN).

Tabelul 16. Analiză inter-teste – mbc r și ABL pe linii celulare

Linie celulară	Diluție	C_T mediu	SD	n	CV (%)
mbcr	5×10^{-3} (5 ng/1 μ g)	29,19	0,26	20	0,88
	5×10^{-4} (0,5 ng/1 μ g)	33,70	0,48	20	1,47
	5×10^{-5} (0,05 ng/1 μ g)	37,03	1,16	20	3,15
ABL	–	25,01	0,87	100	3,46

Tabelul 17. Analiză inter-teste – plasmide

Genă	Plasmidă	C _T mediu	SD	n	CV (%)
mbcr	F1 (10 ¹ copii)	35,19	0,90	11	2,57
	F2 (10 ² copii)	31,87	0,64	12	1,99
	F3 (10 ³ copii)	28,41	0,71	12	2,50
	F4 (10 ⁵ copii)	21,48	0,59	12	2,76
	F5 (10 ⁶ copii)	18,37	0,71	12	3,89
ABL	C1 (10 ³ copii)	29,68	0,85	12	2,86
	C2 (10 ⁴ copii)	26,01	0,51	12	1,96
	C3 (10 ⁵ copii)	22,53	0,42	12	1,86

Tabelul 18. Analiză inter-teste – BCR-ABL mbcr și ABL pe linii celulare (CN mediu)

Linie celulară	Diluție	CN mediu	SD	n	CV (%)
BCR-ABL mbcr	5 x 10 ⁻³ (5 ng/1 μg)	587,30	194,10	20	33,05
	5 x 10 ⁻⁴ (0,5 ng/1 μg)	57,84	20,38	20	35,23
	5 x 10 ⁻⁵ (0,05 ng/1 μg)	4,39	2,73	20	62,35
ABL	–	22.038,22	9459,17	100	42,92

Tabelul 19. Analiză inter-teste – BCR-ABL mbcr pe linii celulare (NCN mediu)

Linie celulară	Diluție	NCN mediu*	SD	n	CV (%)
BCR-ABL mbcr	5 x 10 ⁻³ (5 ng/1 μg)	267,46	93,22	20	34,85
	5 x 10 ⁻⁴ (0,5 ng/1 μg)	23,54	7,36	20	31,28
	5 x 10 ⁻⁵ (0,05 ng/1 μg)	2,60	2,80	20	107,66

* Exclusiv pentru aceste rezultate ale studiului, $\frac{\text{BCR-ABL mbcr}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10.000$.
NCN este exprimat ca

Studii clinice

Evaluarea performanței a fost efectuată pe un ABI PRISM 7700 SDS, în combinație cu reactivii enumerați în „Materiale necesare, dar nefurnizate”, pagina 8. Studiile de echivalență au validat utilizarea pe următoarele instrumente: Instrumentele ABI PRISM 7000 și 7900HT SDS, LightCycler 1.2 și 480, Rotor-Gene 3000 și SmartCycler (6).

Un grup de 26 de laboratoare, din 10 țări europene, organizate într-o acțiune concertată a Europe Against Cancer (EAC), a folosit plasmide furnizate de IPSOGEN pentru a stabili un protocol standardizat pentru analiza qPCR a genelor de fuziune majore asociate cu leucemia în mediul clinic. Transcripția BCR-ABL p190 a fost una dintre genele de fuziune (Fusion Gene, FG) incluse în studiu. Prezentăm aici un rezumat al acestui studiu de validare; rezultatele complete au fost publicate în 2003 (4, 7).

Reproductibilitatea inter-laboratoare pentru standardele de plasmide CG și FG

Unsprezece laboratoare au efectuat un experiment de reproductibilitate inter-laboratoare pentru a evalua variabilitatea în măsurarea diluțiilor standard de plasmide CG și FG. Diluțiile au fost efectuate în duplicat la fiecare unitate. Tabelul 20 raportează media, abaterea standard și CV (%) pentru fiecare diluție.

Tabelul 20. Reproductibilitatea inter-laboratoare pentru standardele de plasmide CG și FG

Genă	Diluție	Medie	C _T SD	CV (%)
Genă de control ABL	C1	29,04	0,53	1,82
	C2	25,64	0,47	1,84
	C3	22,10	0,34	1,55
Genă de fuziune BCR-ABL mbcr	F1	35,99	1,18	3,28
	F2	32,05	0,74	2,32
	F3	28,43	0,65	2,29
	F4	21,60	0,59	2,72
	F5	18,24	0,46	2,57

Valorile expresiilor transcripției FG BCR-ABL mbcr

Tabelele 21 și 22 arată valorile expresiilor transcripției FG BCR-ABL mbcr și CG ABL pentru linia celulară TOM1, TOȚI pacienții la diagnosticare și pacienții normali.

Tabelul 21. Valorile expresiilor transcripției FG BCR-ABL mbcr și CG ABL – valori C_T

	Valori C _T (interval 95 %)	
	BCR-ABL mbcr	ABL
Linie celulară TOM1	22,8	21,8
TOATE probele de la pacienți		
MO (n = 17)	24,7 (21,3-27,1)	24,5 (21,7-27,1)
SP (n = 7)	23,3 (21,7-29,1)	22,5 (21,0-27,0)
Probe de la pacienți negative		
MO (n = 26)	–	25,35 (24,68-26,02)
SP (n = 74)	–	25,15 (24,83-25,48)

Tabelul 22. Valorile expresiilor transcripției FG BCR-ABL mbcr și CG ABL – valori CN și NCN

	Valori CN (interval 95 %)		Valori NCN (interval 95 %)
	BCR-ABL mbcr	ABL	CN BCR-ABL mbcr/CN ABL
TOATE probele de la pacienți			
MO (n = 17)	9550 (1738-97.724)	11.912 (5012-70.795)	0,8 (0,35-1,38)
SP (n = 7)	91.201 (1905-208.930)	134.896 (4786-114.815)	0,68 (0,4-1,82)
Probe de la pacienți negative			
MO (n = 26)	–	19.201 (12.922-25.480)	–
SP (n = 74)	–	21.136 (17.834-24.437)	–

Valorile ABL C_T nu au diferit semnificativ între probele normale și cele leucemice, nici între tipurile de probe (SP sau MO) sau probele cu leucemie (LAL, LMA, LMC).

Rate fals pozitive și fals negative

Ratele fals negative și fals pozitive au fost calculate utilizând următoarele substanțe de control.

- Substanțe de control pozitive: Celule TOM1, o linie celulară bine cunoscută pentru pozitivitatea sa pentru gena de fuziune BCR-ABL p190; probe de la pacienți deja evaluate pentru pozitivitatea p190
- Substanțe de control negative: Probe de ARN negative, substanțe de control fără amplificare (No Amplification Control, NAC) compuse din ARN de *E. coli* în loc de ARN uman pentru verificarea contaminării PCR și substanțe de control fără șablon (No Template Control, NTC), care au conținut apă în loc de ARN uman

Amplificarea pe probele de ARN ale FG a fost făcută în triplicat și în duplicat pentru CG.

O probă fals negativă a fost definită ca o probă de ARN pozitivă cu mai puțin de 50 % din godeuri pozitive (0/2, 0/3 sau 1/3).

O probă fals pozitivă a fost definită ca o probă negativă cu cel puțin 50 % din godeuri pozitive (1/2, 2/3 sau 3/3).

Tabelul 23 arată numărul și procentul de probe fals negative și fals pozitive.

Tabelul 23. Probe fals negative și fals pozitive

Falsă negativitate		Falsă pozitivitate	
10 ⁻³	10 ⁻⁴	Substanță de control negativă la FG	NAC/NTC
0 % (0/54)	4 % (3/75)	4,8 % (6/126)	5,8 % (7/120)

Referințe

QIAGEN păstrează o bază de date online generoasă și actualizată, de publicații științifice privind utilizarea produselor QIAGEN. Opțiunile comprehensive de căutare vă permit să găsiți articolele necesare, fie prin intermediul unei căutări simple după cuvinte-cheie, fie prin specificarea aplicației, a domeniului de cercetare, a titlului etc.











Pentru o listă completă a referințelor, vizitați QIAGEN Reference Database online, la www.qiagen.com/RefDB/search.asp sau contactați Serviciile Tehnice QIAGEN sau distribuitorul local.

Referințe citate

1. Thomas, D.A. (2007) Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukemia: a new era of challenges. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2007**, 435.
2. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and van Dongen, J.J. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
3. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.
4. Gabert, J. et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* **17**, 2318.
5. Hughes, T. et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* **108**, 28.
6. Silvy, M., Mancini, J., Thirion, X., Sigaux, F., and Gabert, J. (2005) Evaluation of real-time quantitative PCR machines for the monitoring of fusion gene transcripts using the Europe against cancer protocol. *Leukemia* **19**, 305.
7. Beillard, E. et al. (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.

Simboluri

Pe ambalaj și pe etichete pot apărea următoarele simboluri:

	Conține reactivi suficienți pentru <N> reacții
	Data de expirare
	Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro
	Număr catalog
	Număr de lot
	Număr material
	Număr de comercializare global articol
	Limitări de temperatură
	Producător
	Consultați instrucțiunile de utilizare

Date de contact

Pentru asistență tehnică și informații suplimentare, consultați Centrul nostru pentru Asistență Tehnică la adresa www.qiagen.com/Support, apălați numărul de telefon 00800-22-44-6000 sau contactați Departamentele de Servicii Tehnice ale QIAGEN sau distribuitorii locali (a se vedea coperta a patra sau vizitați www.qiagen.com).

Informații pentru comandă

Produs	Cuprins	Nr. cat.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Kit (24)	Pentru 24 de reacții: Standarde pentru gena de control ABL, standarde pentru gena de fuziune BCR-ABL mbc, amestec de soluție de amorsare și sondă ABL, amestec de soluție de amorsare și sondă genă de fuziune BCR-ABL mbc	670023
Rotor-Gene Q MDx – pentru analiza real-time PCR validată de IVD în aplicații clinice		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclator pentru real-time PCR și analizor de topire la înaltă rezoluție cu 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins) plus canal HRM, laptop, software, accesorii: garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalarea și instruirea nu sunt incluse	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclator pentru real-time PCR și analizor de topire la înaltă rezoluție cu 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins) plus canal HRM, laptop, software, accesorii: garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalare și instruire	9002033
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit – pentru validarea calitativă a extracției de ARN și transcrierea inversă a genei de fuziune BCR-ABL mbc		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit	Linii celulare cu expresie negativă, puternic pozitivă și slab pozitivă a genei de fuziune BCR-ABL mbc	670091

Pentru informații actualizate privind licențele și clauzele de declinare a răspunderii specifice produselor, consultați ghidul sau manualul de utilizare al kitului QIAGEN respectiv. Ghidurile și manualele de utilizare pentru kiturile QIAGEN sunt disponibile pe www.qiagen.com sau pot fi solicitate de la Serviciile tehnice QIAGEN sau distribuitorul dumneavoastră local.

Acest produs este destinat utilizării pentru diagnosticarea in vitro. Produsele *ipsogen* nu pot fi revândute, modificate pentru revânzare sau utilizate pentru fabricarea de produse comerciale fără aprobarea scrisă a companiei QIAGEN.

Informațiile din acest document fac obiectul modificării fără preaviz. QIAGEN nu își asumă nicio responsabilitate pentru eventualele erori care pot apărea în acest document. Se consideră că acest document este complet și exact în momentul publicării. În niciun caz, compania QIAGEN nu va fi răspunzătoare pentru niciun fel de daune incidente, speciale, multiple sau consecință în legătură cu sau care decurg din utilizarea acestui document.

Se garantează că produsele *ipsogen* întrunesc specificațiile declarate. Singura obligație a companiei QIAGEN și despăgubirea exclusivă a clientului se limitează la înlocuirea gratuită a produselor în cazul în care acestea nu funcționează conform garanției.

Mărci comerciale: QIAGEN®, *ipsogen*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, FAM™, RNaseOUT™, SuperScript®, SYBR®, TAMRA™ (Life Technologies Corporation); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Excel® (Microsoft Corporation); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); SmartCycler® (Cepheid).

Acord de licență limitată

Utilizarea acestui produs implică acceptarea următoarelor clauze de către oricare cumpărător sau utilizator al *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kit:

1. *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Kit poate fi utilizat numai în conformitate cu manualul *ipsogen BCR-ABL1 mbc Kit* și numai împreună cu componentele conținute în kit. QIAGEN nu acordă nicio licență pentru niciuna dintre proprietățile sale intelectuale în vederea utilizării sau încorporării componentelor incluse în acest kit cu orice componentă care nu este inclusă în acest kit, cu excepția celor descrise în manualul *ipsogen BCR-ABL1 mbc Kit* și în protocoalele suplimentare disponibile la adresa www.qiagen.com.
2. În afară de licențele acordate în mod explicit, QIAGEN nu garantează sub nicio formă că acest kit și/sau utilizarea (utilizările) acestuia nu încalcă drepturile terților.
3. Acest kit și componentele sale sunt licențiate pentru o singură utilizare și nu pot fi reutilizate, recondiționate sau revândute.
4. QIAGEN declină în mod specific orice licențe, explicite sau implicite, altele decât cele declarate în mod explicit.
5. Cumpărătorul și utilizatorul kitului acceptă să nu ia măsuri și să nu permită niciunei persoane să ia măsuri care ar putea conduce la sau facilita oricare dintre acțiunile interzise prezentate mai sus. QIAGEN poate pune în aplicare interdicțiile din acest Acord de licență limitată în orice instanță și va recupera toate costurile anchetelor și cheltuielile de judecată, inclusiv onorariile avocaților, în orice acțiune pentru aplicarea acestui Acord de licență limitată sau a oricăruia dintre drepturile sale de proprietate intelectuală legate de kit și/sau componentele acestuia.

Pentru termenii actualizați ai licenței, consultați www.qiagen.com.

HB-1357-002 © 2013–2015 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

