

Noiembrie 2017

Manual *ipsogen*[®] PML-RARA bcr1 Kit



Versiunea 1

Cantitativ în diagnosticare in vitro

Pentru utilizare cu instrumentele Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®],
Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System, LightCycler[®] și
SmartCycler[®]

IVD

CE

REF



R5 MAT

672123

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden
GERMANIA

1108718RO

Sample to Insight



Cuprins

Domeniul de utilizare	4
Rezumatul și explicarea produsului	4
Principiul procedurii	6
Materiale furnizate	9
Conținutul kitului	9
Materiale necesare, dar nefurnizate	10
Avertizări și precauții	12
Precauții generale	12
Depozitarea și manipularea reactivilor	13
Procedură	15
Prepararea ARN-ului pentru probă	15
Protocol: Transcriere inversă EAC standardizată recomandată	15
Protocol: qPCR pe instrumentele Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM sau Rotor-Gene Q 5plex HRM cu rotor cu 72 de tuburi	18
Protocol: qPCR pe instrumentul ABI PRISM 7000, 7700 și 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System și LightCycler 480	22
Protocol: qPCR pe instrumentele LightCycler 1.2 și 2.0	26
Protocol: qPCR pe instrumentul SmartCycler	30
Interpretarea rezultatelor	34
Principiul analizei datelor	34
Rezultatele	35
Ghid de depanare	38

Controlul calității	41
Limitări	41
Caracteristici de performanță	42
Studii nonclinice	42
Studii clinice	45
Referințe	49
Simboluri	50
Informații pentru comandă	51

Domeniul de utilizare

ipsogen PML-RARA bcr1 Kit este destinat cuantificării transcripțiilor de fuziune *bcr1* de tip PML-RARA în probe de măduvă osoasă sau de sânge periferic la un subgrup de pacienți cu leucemie mieloidă acută (LMA) diagnosticați cu citomorfologie M3 și translocare $t(15;17)(q22;q21)$, cu un punct critic în PML intronul 6. Rezultatele obținute sunt destinate a fi utilizate ca ajutor pentru monitorizarea eficacității tratamentului la pacienții care urmează tratament și pentru urmărirea bolii reziduale minime (minimal residual disease, MRD) pentru a monitoriza recidivarea bolii.

Rezumatul și explicarea produsului

Transcripțiile genei de fuziune (fusion gene, FG) PML-RARA, care sunt rezultatul molecular al translocării $t(15;17)(q22;q21)$, sunt asociate cu majoritatea cazurilor de leucemie progranulocitară acută (progranulocytic leukemia, APL) (> 90 %), un subset distinct de LMA cu citomorfologie M3 care reprezintă 10-15 % din toate cazurile de LMA. Translocarea reciprocă echilibrată $t(15;17)$ duce la fuziunea genei leucemiei promielocitare (promyelocytic leukemia, PML) cu receptorul alfa al acidului retinoic (retinoic acid receptor alpha, RARA) pentru a genera proteina de fuziune PML-RARA. Proteina himerică PML-RARA este un represor transcripțional. Expresia sa este asociată cu diferențierea mieloidă afectată, datorită afinității crescute pentru complexul de proteine represoare nucleare (nuclear repressor protein complex, NcoR), alterarea structurii cromatinei de către histon deacetilază (HDAC) și inhibarea transcripției. Tratamentul cu acid all-trans retinoic (all-trans retinoic acid, ATRA) este foarte eficient în APL și acționează ca un agent de diferențiere prin promovarea eliberării complexului NCoR/HDAC, restabilind astfel transcripția normală.

Punctele critice RARA apar întotdeauna în intronul 2. În funcție de locația punctelor critice în zona PML, intronul 6, exonul 6 și intronul 3, se pot forma subtipurile respective de transcripție PML-RARA denumite lungi (L sau *bcr1*), variantă (V sau *bcr2*) și scurte (S sau *bcr3*) (Figura 1). Aceste subtipuri de transcripție reprezintă 55 %, 5 % și, respectiv, 40 % din cazuri.

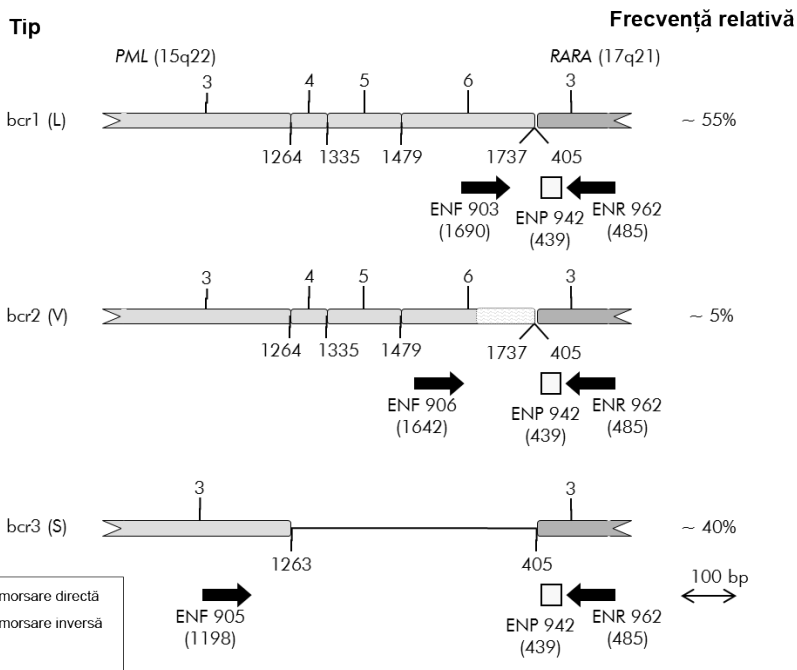


Figura 1. Diagrama schematică a transcripției FG PML-RARA, acoperită de setul de soluții de amorsare și sonde EAC qPCR. Pentru tipul bcr1 (L): ENF903–ENP942–ENR962. Pentru tipul bcr2 (V): ENF906–ENP942–ENR962. Pentru tipul bcr3 (S): ENF905–ENP942–ENR962. Numărul de sub soluțiile de amorsare și sonde se referă la poziția nucleotidică a acestora în transcripția genei normale. Frecvența relativă se referă la proporția fiecărui tip de transcripție a genei de fuziune între variantele PML-RARA.

Tratamentul combinat cu chimioterapie pe bază de antraciclină și ATRA are un mare succes în APL, oferind remisiuni de lungă durată și vindecare probabilă la până la 70% dintre pacienții nou diagnosticați. Cu toate acestea, la 15-25 % dintre pacienți sunt încă observate recidiva și rate scăzute de supraviețuire. Detecția genei unice de fuziune PML-RARA prin revers-transcriere-reacție de polimerizare în lanț (RT-PCR) convențională a fost utilizată pe scară largă pentru diagnosticarea rapidă și predicția răspunsului la terapiei. Cu toate acestea, această tehnică prezintă dezavantaje și sensibilitatea sa este relativ scăzută.

Cuantificarea numărului de copii PML-RARA prin PCR cantitativ în timp real (qPCR) prezintă mai multe avantaje. Este o tehnică foarte sensibilă și reproductibilă, care permite, de asemenea, o evaluare a cineticii. Analiza valorii de pronostic a unui protocol qPCR standardizat bine stabilit (Programul EAC) la pacienții cu APL în timpul diferitelor faze de tratament a indicat că această abordare este o alternativă solidă pentru evaluarea MRD și că stratificarea riscului de recidivă poate fi stabilită pe baza numărului de copii normalizat PML-RARA. În timpul analizei post-consolidare, testul qPCR pozitiv este un element de predicție puternic al recidivei hematologice ulterioare. În timpul terapiei de întreținere și după sfârșitul tratamentului, un test qPCR pozitiv este asociat cu un risc mai mare de recidivă și o perioadă de supraviețuire mai scurtă. Stratificarea riscului de recidivă bazată pe cuantificarea numărului de copii normalizat (normalized copy number, NCN) PML-RARA împarte pacienții în 3 grupuri: cei cu risc ridicat de recidivă, cei cu risc intermediar și cei cu risc scăzut de recidivă (1). Monitorizarea PML-RARA prin detecția sensibilă a transcripției este considerată o parte integrantă a strategiei generale de tratament în APL (consultați referințele 2 și 3 pentru detalii), prin care tipul și intensitatea tratamentului sunt modulate la pacienții cu riscuri diferite de recidivă în timpul monitorizării.

Standardizarea și validarea metodei de cuantificare MRD au fost stabilite într-un proiect multicentric condus de EAC și publicat în 2003 (4, 5). *ipsogen PML-RARA bcr1 Kit* se bazează pe această tehnică.

Principiul procedurii

Tehnica qPCR permite cuantificarea cu precizie a produșilor PCR în timpul fazei exponențiale a procesului de amplificare PCR. În plus, datele qPCR 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 de colorantul substanță extincătoare de fluorescență are ca rezultat suprimarea fluorescenței raportor în primul rând 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.

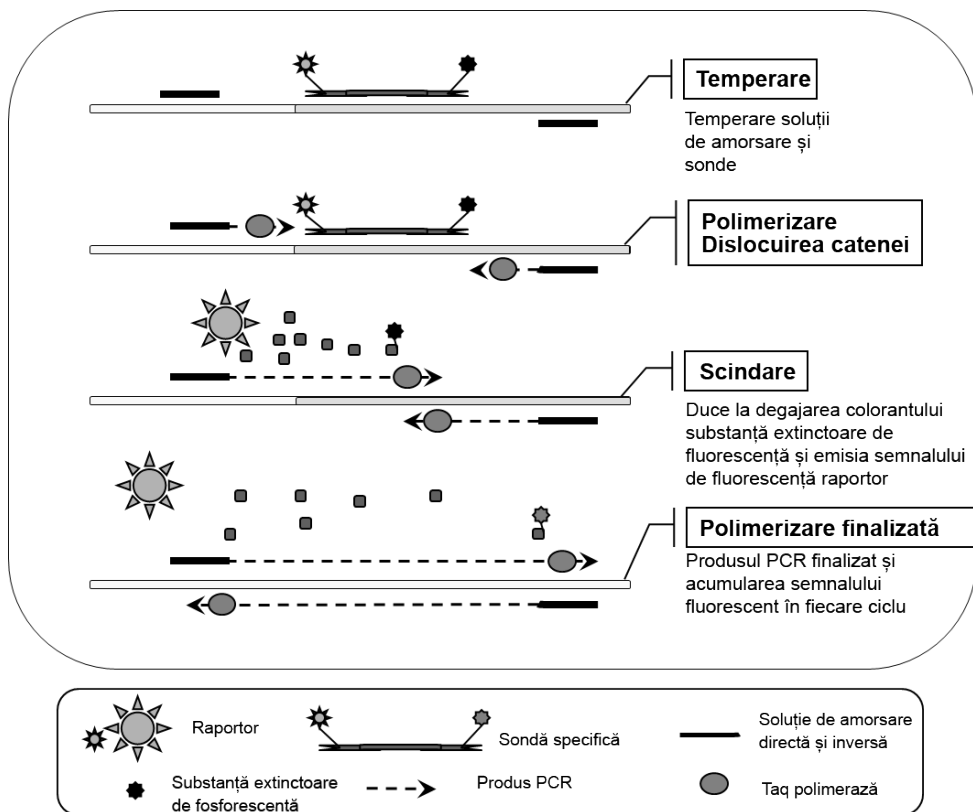


Figura 2. Principiul reacției. ARN-ul total este transcris invers, iar ADN-ul complementar generat este amplificat prin PCR utilizând o pereche de soluții de amorsare specifice și o sondă internă specifică cu colorant dublu (FAM™–TAMRA™). Sonda se leagă de amplicon în timpul fiecărei etape de temperare a PCR. Când Taq 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 se topește de pe amplicon. 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

<i>ipsogen PML-RARA bcr1 Kit</i>		(24)
Număr de catalog		672123
Număr de reacții		24
Componentă	Nume	Cantitate
ABL Control Gene Standard Dilution (Diluție standard genă de control ABL) (10 ³ copii/5 μl)	C1-ABL	50 μl
ABL Control Gene Standard Dilution (Diluție standard genă de control ABL) (10 ⁴ copii/5 μl)	C2-ABL	50 μl
ABL Control Gene Standard Dilution (Diluție standard genă de control ABL) (10 ⁵ copii/5 μl)	C3-ABL	50 μl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Diluție standard genă de fuziune PML-RARA bcr1) (10 ¹ copii/5 μl)	F1-PML-RARA bcr1	50 μl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Diluție standard genă de fuziune PML-RARA bcr1) (10 ² copii/5 μl)	F2-PML-RARA bcr1	50 μl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Diluție standard genă de fuziune PML-RARA bcr1) (10 ³ copii/5 μl)	F3-PML-RARA bcr1	50 μl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Diluție standard genă de fuziune PML-RARA bcr1) (10 ⁵ copii/5 μl)	F4-PML-RARA bcr1	50 μl

<i>ipsogen PML-RARA bcr1 Kit</i>		(24)
Număr de catalog		672123
Număr de reacții		24
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Diluție standard genă de fuziune PML-RARA bcr1) (10 ⁶ copii/5 μl)	F5-PML-RARA bcr1	50 μl
Primers and Probe Mix ABL (Amestec de soluții de amorsare și sonde ABL)*	PPC-ABL 25x	90 μl
Primers and Probe Mix PML-RARA bcr1 Fusion Gene (Amestec de soluții de amorsare și sonda gena de fuziune PML-RARA bcr1) [†]	PPF-PML-RARA bcr1 25x	110 μl
<i>Manual ipsogen PML-RARA bcr1 Kit (limba engleză)</i>		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 PML-RARA bcr1, 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 adecvați. Pentru informații suplimentare, consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheets, SDS) corespunzătoare, disponibile de la furnizorul produsului.

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

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

Echiptamente

- Micropipete dedicate pentru PCR (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)
- Centrifugă de banc cu rotor pentru tuburi de reacție de 0,2 ml/0,5 ml (cu o turație maximă de 13.000/14.000 rot/min)
- Instrument pentru real-time PCR: Instrumentul Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM sau alt instrument Rotor Gene Q; LightCycler 1.2, 2.0, or 480; ABI PRISM 7000, 7700 sau 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System sau SmartCycler și materiale specifice asociate
- Termociclor sau baie de apă (etapa de transcriere inversă)

Reactivi complementari

- *ipsogen PML-RARA bcr1 Controls Kit* (nr. cat. 672091) doar pentru utilizare pentru cercetare, format din linii celulare cu expresie negativă, puternic și slab pozitivă a genei de fuziune PML-RARA bcr1 pentru validarea calitativă a extracției ARN și a transcrierii inverse

Avertizări 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 adecvați. Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheet, SDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online în format PDF la adresa www.qiagen.com/safety, unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișa SDS pentru fiecare kit QIAGEN și pentru componentele kiturilor.

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

Precauții generale

Utilizarea testărilor 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 utilizând 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 °C în părți alicote.
- Preparați hexamer aleatoriu, 100 μM. Depozitați la -20 °C în părți alicote.
- Preparați MgCl₂, 50 mM. Depozitați la -20 °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 °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 adecvați.

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
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 μ l de apă de calitate PCR fără nuclează, astfel încât volumul final să fie de 50 μ l.
 12. Efectuați PCR în conformitate cu următoarele protocoale, conform instrumentului dumneavoastră qPCR.

Protocol: qPCR pe instrumentele 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 PML-RARA bcr1 (PPF-PML-RARA bcr1)	
n probe de ADN complementar	n x 2 reacții
Standardul PML-RARA	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.

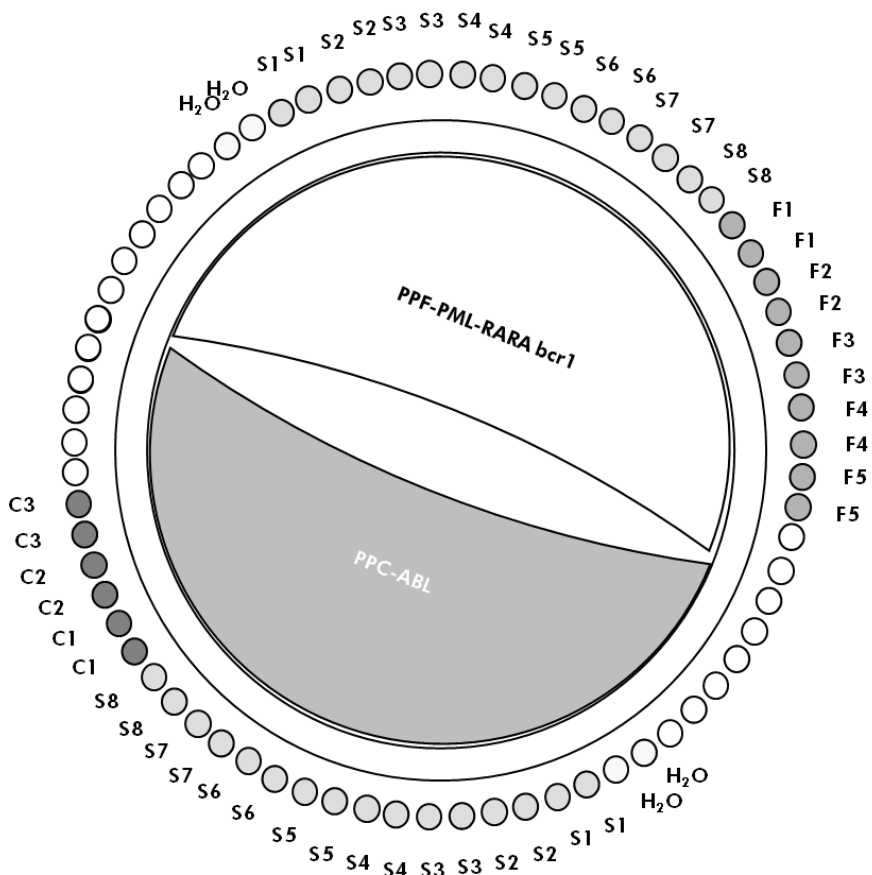


Figura 3. Configurarea sugerată a rotorului pentru fiecare experiment efectuat cu *ipsogen PML-RARA bcr1 Kit*.

F1-5: standardele PML-RARA bcr1; C1-3: standardele 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-PML-RARA bcr1). Sunt incluse volume suplimentare pentru a compensa eroarea de pipetare.

Tabelul 4. Prepararea amestecului qPCR

Componentă	1 reacție (μ l)	ABL: 24 + 1 reacții (μ l)	PML-RARA bcr1: 28 + 1 reacții (μ l)	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 tub.
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 15) în tubul corespunzător (volum total 25 µl).
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	Cuantificare
Reținere	Temperatură: 50 deg (50 de grade) Time (Timp): 2 minute
Hold 2 (Reținere 2)	Temperatură: 95 de grade Time (Timp): 10 minute
Ciclare	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. Porniți programul de termociclare, așa cum este indicat în Tabelul 5.
9. Pentru instrumentele Rotor-Gene Q, selectați „Slope Correct” (Corecție pantă) pentru analiză. Vă recomandăm să setați pragul la 0,03.

Protocol: qPCR pe instrumentul ABI PRISM 7000, 7700 și 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System și 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 PML-RARA bcr1 (PPF-PML-RARA bcr1)	
n probe de ADN complementar	n x 2 reacții
Standardul PML-RARA	2 x 5 reacții (5 diluții, fiecare testată în duplicat)
Substanță de control apă	2 reacții

Procesarea probelor pe instrumentele ABI PRISM 7000, 7700 and 7900 SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System și 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.

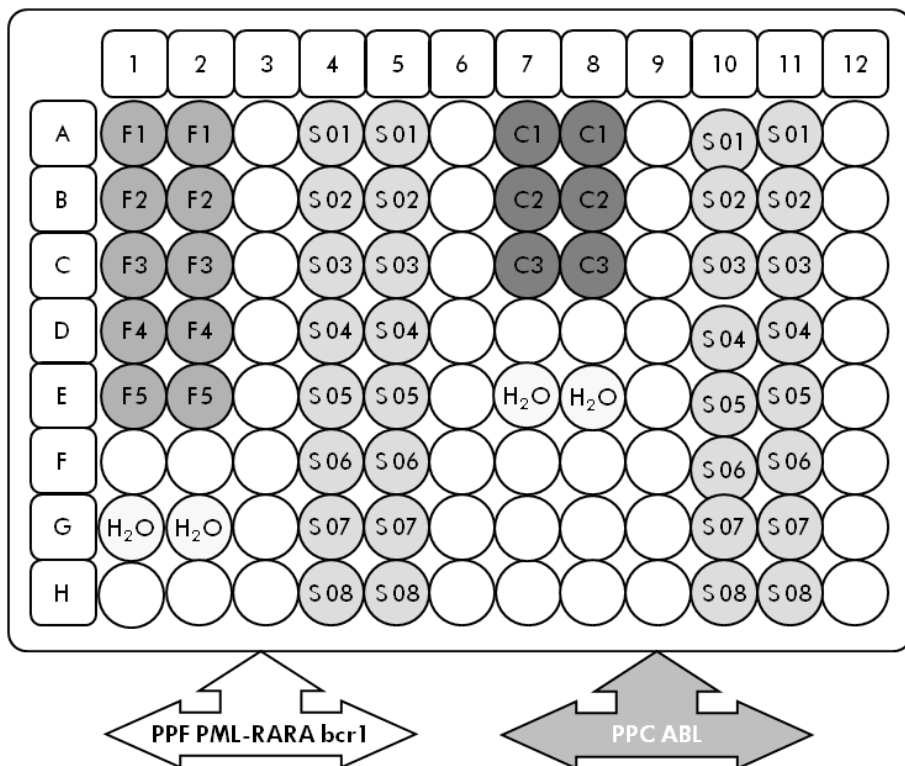


Figura 4. Configurarea sugerată a plăcilor pentru un experiment. S: probă de ADN complementar; F1-5: standardele PML-RARA bcr1; C1-3: standardele ABL; H₂O: substanță de control apă.

qPCR pe instrumentele ABI PRISM 7000, 7700 and 7900 SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System și 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.

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 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-PML-RARA bcr1). Sunt incluse volume suplimentare pentru a compensa eroarea de pipetare.

Tabelul 7. Prepararea amestecului qPCR

Componentă	1 reacție (μl)	ABL: 24 + 1 reacții (μl)	PML-RARA bcr1: 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	–

- Distribuiți 20 μ l de amestec qPCR preliminar per godeu.
- 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 15) în godeul corespunzător (volum total 25 μ l).
- Amestecați ușor, prin pipetare pe verticală.
- Închideți placa și centrifugați pentru scurt timp (300 x g, aproximativ 10 secunde).
- 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 și Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System sau Tabelul 9 pentru instrumentul LightCycler 480.

Tabelul 8. Profilul temperaturii pentru ABI PRISM 7000, 7700 and 7900HT SDS și Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System

Modul de analiză	Curba standard – Cuantificare absolută
Reținere	Temperatură: 50 °C Time (Timp): 2 minute
Hold 2 (Reținere 2)	Temperatură: 95 °C Time (Timp): 10 minute
Ciclare	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)
Reținere	Temperatură: 50 °C Time (Timp): 2 minute
Hold 2 (Reținere 2)	Temperatură: 95 °C Time (Timp): 10 minute
Ciclare	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, precum și Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, urmați pasul 8a. Pentru LightCycler 480, parcurgeți etapa 8b.
- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 și 7900HT SDS, precum și Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: Vă recomandăm un prag setat la 0,1 așa cum este descris în protocolul EAC în etapa de analiză și o linie de bază setată între ciclurile 3 și 15. Porniți programul de ciclare, așa cum este indicat în Tabelul 8.
- 8b. 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 instrumentele 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 PML-RARA bcr1 (PPF-PML-RARA bcr1)	
n probe de ADN complementar	n x 2 reacții
Standardul PML-RARA	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.

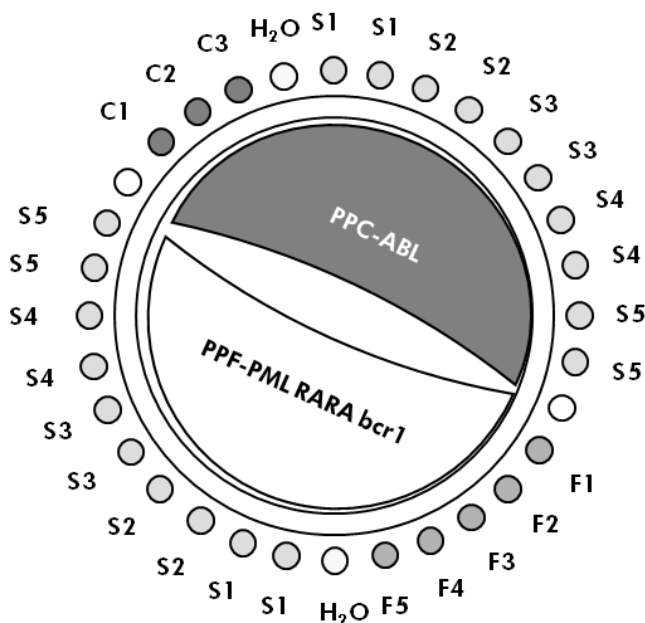


Figura 5. Configurația sugerată a rotorului pentru fiecare experiment efectuat cu *ipsogen PML-RARA bcr1 Kit*.

F1-5: standardele PML-RARA bcr1; 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 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-PML-RARA bcr1). Sunt incluse volume suplimentare pentru a compensa eroarea de pipetare.

Tabelul 11. Prepararea amestecului qPCR

Componentă	1 reacție (μl)	ABL: 14 + 1 reacții (μl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 reacții (μl)	Concentrație finală
LightCycler TaqMan Master Mix, 5x proaspăt preparat	4,0	60,0	68,0	1x
Amestec de soluții de amorsare și sonde, 25x	0,8	12,0	13,6	1x
Apă de calitate PCR fără nuclează	10,2	153,0	173,4	–
Probă (de adăugat la pasul 4)	5	Câte 5	Câte 5	–
Volum total	20	Câte 20	Câte 20	–

3. Distribuți 15 μ l de amestec qPCR preliminar per capilar.
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 15) în tubul corespunzător (volum total 20 μ l).

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 în termociclor, conform recomandărilor producătorului.
8. Programați instrumentele 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
Reținere	Temperatură: 95 °C Time (Timp): 10 minute Rampă: 20
Ciclare	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

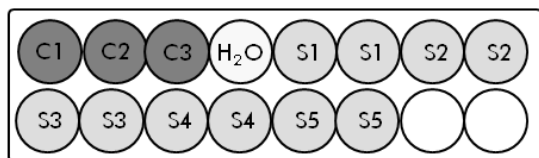
Dacă utilizați acest instrument, recomandăm măsurarea probelor în duplicat și a substanțelor de control o singură dată, așa cum este indicat în Tabelul 13.

Tabelul 13. Număr de reacții pentru instrumentul SmartCycler

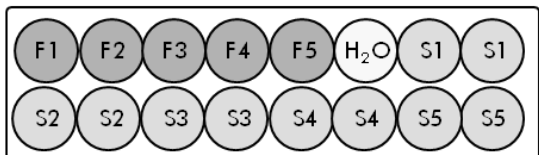
Probele	Reacții
Cu amestecul de soluții de amorsare și sonde ABL (PPC-ABL)	
n probe de ADN complementar	n x 2 reacții
Standard ABL	1 x 3 reacții (3 diluții standard, fiecare testată o singură dată)
Substanță de control apă	1 reacție
Cu amestecul de soluții de amorsare și sonde PML-RARA bcr1 (PPF-PML-RARA bcr1)	
n probe de ADN complementar	n x 2 reacții
Standardul PML-RARA	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-PML-RARA bcr1

Figura 6. Configurarea sugerată a plăcilor pentru un experiment. S: probă de ADN complementar; F1-5: standardele PML-RARA bcr1; C1-3: standardele ABL; H2O: substanță de control apă.

qPCR pe instrumentul SmartCycler

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 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-PML-RARA bcr1). Sunt incluse volume suplimentare pentru a compensa eroarea de pipetare.

Tabelul 14. Prepararea amestecului qPCR

Componentă	1 reacție (μl)	ABL: 14 + 1 reacții (μl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 reacții (μl)	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 15) 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

Reținere	Temperatură 50 °C Time (Timp): 2 minute
Hold 2 (Reținere 2)	Temperatură: 95 °C Time (Timp): 10 minute
Ciclare	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.

Folosind standarde cu un număr cunoscut de molecule, se poate stabili o curbă standard și se poate determina cantitatea precisă de țintă prezentă în proba de testare. Curbele standard *ipsogen* sunt bazate pe plasmide; folosim 3 diluții standard de plasmide pentru gena de control (control gene, CG) ABL și 5 diluții standard pentru gena de fuziune (fusion gene, FG) (PML-RARA *bcr1*), pentru a asigura curbe standard de precizie. Figurile 7 și 8 prezintă un exemplu de curbe de amplificare TaqMan, obținute cu *ipsogen PML-RARA bcr1 Kit*.

- ABL 10^3
- ABL 10^4
- ABL 10^5

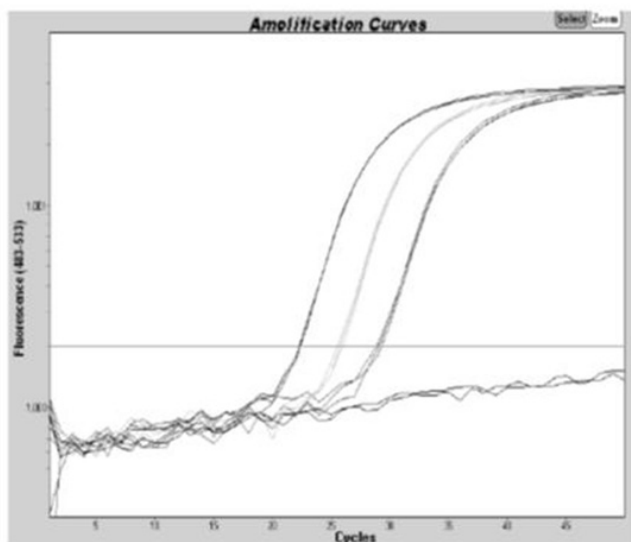


Figura 7. Detecția standardelor ABL (C1, C2, C3). 10^3 , 10^4 și 10^5 copii/5 μ l.

- PML-RARA bcr1 10¹
- PML-RARA bcr1 10²
- PML-RARA bcr1 10³
- PML-RARA bcr1 10⁵
- PML-RARA bcr1 10⁶

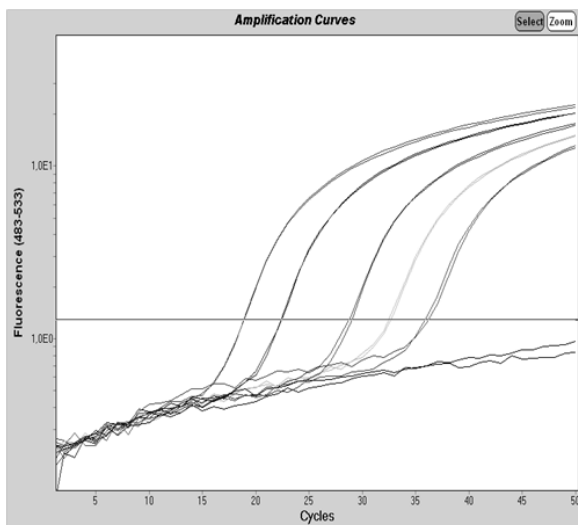


Figura 8. Detectarea standardelor PML-RARA bcr1 (F1-F5). 10¹, 10², 10³, 10⁵ și 10⁶ copii/5 µl.

Rezultatele

Curba standard și criteriile de control al calității

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

Pentru fiecare genă (ABL și PML-RARA), 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.

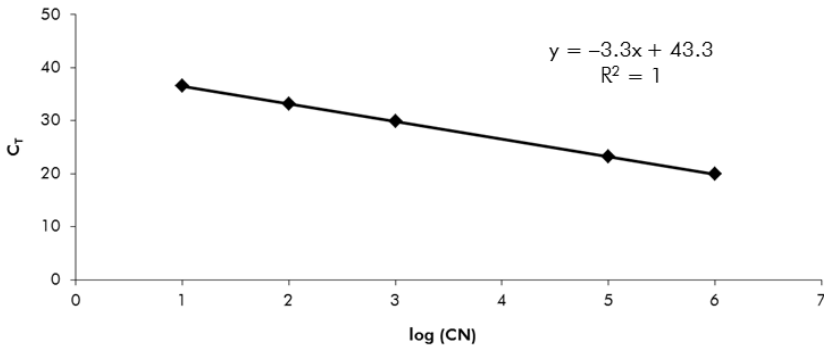


Figura 9. Curba teoretică calculată din cele 5 diluții standard. Se calculează o curbă de regresie liniară ($y = ax + b$) pentru fiecare genă (ABL și PML-RARA), unde a este panta dreptei și b este intersecția în y , care este coordonata y a punctului în care linia intersectează axa y . Ecuația și coeficientul 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 $>0,95$ (6). Cu toate acestea, pentru rezultate de precizie se recomandă o valoare pentru $R^2 >0,98$ (7).

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 PML-RARA ar trebui utilizată pentru a transforma valorile brute C_T (obținute cu PPF-PML-RARA) pentru probele necunoscute, în numere de copii PML-RARA ($PML-RARA_{CN}$).

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

$$NCN = \frac{PML-RARA_{CN}}{ABL_{CN}}$$

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 $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$.

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

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 5).

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 (6).

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 mai multe informații, consultați coordonatorul clinic sau vizitați www.qiagen.com.

Comentarii și sugestii

Rezultat negativ pentru gena de control (ABL) și PML-RARA bcr1 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 (<i>ipsogen PML-RARA bcr1 Controls Kit</i> , nr. cat. 672091*). |
| 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 PML-RARA bcr1 Controls Kit</i> , nr. cat. 672091*). |

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 (<i>ipsogen PML-RARA bcr1 Controls Kit</i> , nr. cat. 672091*). |
| 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 PML-RARA bcr1 Controls Kit</i> , nr. cat. 672091*). |

Comentarii și sugestii

Semnal standard negativ

- a) Eroare la pipetare Verificați schema de pipetare și configurarea reacției.
Repetati testarea PCR.
- b) Depozitarea Depozitati *ipsogen PML-RARA bcr1 Kit* la o
necorespunzătoare a temperatură cuprinsă între -15 și
componentelor kitului -30 °C și feriti de lumină amestecurile de soluții de
amorsare și sonde (PPC și PPF). Consultați
„Depozitarea și manipularea reactivilor”, pagina 13.
Evitati ciclurile repetate de congelare și decongelare.
Divizati reactivii în părți alicote pentru depozitare.

Substanțele de control negative sunt pozitive

- Contaminare încrucișată Înlocuiți toți reactivii critici.
Repetati experimentul cu noi părți alicote din toți
reactivii.
Manipulati 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 Verificați schema de pipetare și configurarea reacției.
reactivi omiși Repetați testarea PCR.
- b) Efecte inhibitoare ale Repetați prepararea ARN-ului.
materialului de probă,
cauzate de o purificare
insuficientă
- c) LightCycler: Canal de Setati Channel Setting (Setare canal) la F1/F2 sau la
detectie ales greșit 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: Achiziția de Verificați programele de ciclare.
date nu a fost programată
Selectati modul de achiziție „single” (unic) la sfârșitul
fiecărui segment de temperare al programului PCR.

Comentarii și sugestii

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 (*ipsogen PML-RARA bcr1 Controls Kit*, nr. cat. 672091*).
- 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 PML-RARA bcr1 Controls Kit*, nr. cat. 672091*).

Intensitatea fluorescenței este prea mică

- a) Depozitarea necorespunzătoare a componentelor kitului
- Depozitați *ipsogen PML-RARA bcr1 Kit* la o temperatură cuprinsă 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 13.
- 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 modul 530 nm/640 nm.

Comentarii și sugestii

- | | |
|---|---|
| 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 modul 530 nm/640 nm.
--------------------	--

***Notă:** *ipsogen PML-RARA bcr1 Controls Kit*, nr. cat. 672091, este destinat exclusiv cercetării. A nu se utiliza în proceduri de diagnosticare. Nicio afirmație sau declarație nu are scopul de a furniza informații pentru diagnosticarea, prevenția sau tratarea unei boli.

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. Acest kit trebuie utilizat cu respectarea instrucțiunilor din acest manual, împreună cu un instrument validat, menționat în „Materiale necesare, dar nefurnizate”, pagina 10.

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, 5). Acesta trebuie utilizat cu respectarea instrucțiunilor din acest manual, în combinație cu reactivi și instrumente validate. 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 10. Studiile de echivalență au validat utilizarea pe următoarele instrumente: ABI PRISM 7000 și 7900HT SDS, LightCycler 1.2 și 480, Rotor-Gene 3000 și SmartCycler.

Au fost efectuate studii nonclinice pentru a stabili performanța analitică a *ipsogen PML-RARA bcr1 Kit*. Aceste studii nonclinice de laborator au fost efectuate pe ARN total din linia celulară NB4, 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 NB4 (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 200 ng, au fost analizate în 5 replicare per rulare și în 4 rulări diferite. Probele

cu 5 pg și 0,5 pg de ARN NB4 în ARN MV4-11 au fost prea scăzute pentru a da rezultate (Figura 10).

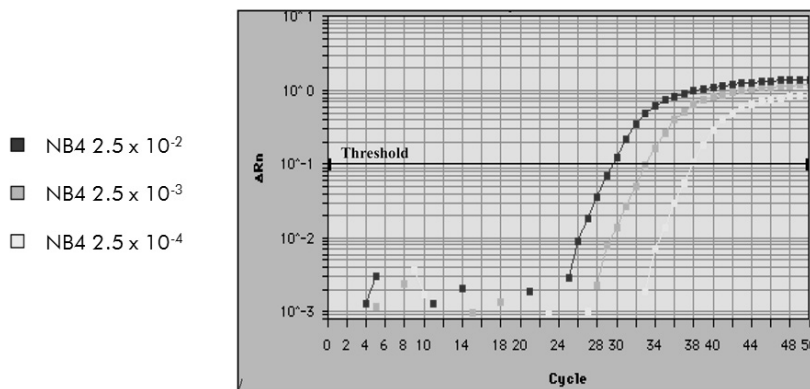


Figura 10. Reprezentări grafice ale amplificării pentru diluțiile $2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng), $2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng) și $2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng) ale ARN-ului total NB4 în ARN total negativ la MV4-11.

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 și intra-teste – PML-RARA și ABL pe linii celulare

Linie celulară	Diluție	Analiza inter-teste				Analiză intra-teste	
		C_T mediu	SD	n	CV (%)	CV mediu	CV max
PML-RARA	5 ng	29,86	0,29	20	0,98	0,32	1,42
	0,5 ng	33,70	0,48	20	1,42	0,56	2,16
	0,05 ng	37,03	0,37	18	1,01	1,07	2,03
ABL	–	24,06	0,22	100	0,92	0,15	2,31

Tabelul 17. Analiză inter-teste – plasmide

Genă	Plasmidă	C _T mediu	SD	n	CV (%)
PML-RARA	F1 (10 ¹ copii)	35,95	0,29	8	0,79
	F2 (10 ² copii)	32,25	0,59	8	1,84
	F3 (10 ³ copii)	28,71	0,55	8	1,90
	F4 (10 ⁵ copii)	22,14	0,49	7	2,23
	F5 (10 ⁶ copii)	18,64	0,72	8	3,84
ABL	C1 (10 ³ copii)	28,85	0,76	7	2,62
	C2 (10 ⁴ copii)	25,25	0,71	8	2,82
	C3 (10 ⁵ copii)	21,74	0,81	8	3,74

Tabelul 18. Analiză inter-teste – PML-RARA bcr1 și ABL pe linii celulare (CN mediu)

Linie celulară	Diluție	CN mediu	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	2,5 x 10 ⁻² (5 ng/200 μg)	583,95	149,19	20	25,55
	2,5 x 10 ⁻³ (0,5 ng/200 ng)	44,98	12,25	20	27,23
	2,5 x 10 ⁻⁴ (0,05 ng/200 ng)	4,91	1,55	19	31,52
ABL	–	35.171,47	22.448,3	99	63,83

Tabelul 19. Analiză inter-teste – PML-RARA bcr1 pe linii celulare (NCN mediu)

Linie celulară	Diluție	NCN mediu*	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	2,5 x 10 ⁻² (5 ng/200 µg)	271,4	150,00	20	55,56
	2,5 x 10 ⁻³ (0,5 ng/200 ng)	15,35	8,12	20	52,87
	2,5 x 10 ⁻⁴ (0,05 ng/200 ng)	1,66	0,91	18	55,14

* Exclusiv pentru aceste rezultate ale studiului, NCN $\frac{\text{PML-RARA bcr1}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10.000$ 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 10. Studiile de echivalență au validat utilizarea pe următoarele instrumente: ABI PRISM 7000 și 7900HT SDS, LightCycler 1.2 și 480, Rotor-Gene 3000 și SmartCycler.

Un grup de 26 de laboratoare, din 10 țări europene, organizate într-o acțiune concertată a 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 PML-RARA bcr1 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, 5).

Reproductibilitatea inter-laboratoare pentru standardele de plasmide CG și FG

În total, 11 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. Reproducibilitatea inter-laboratoare pentru standardele de plasmide CG și FG

Genă	Diluție	Mediu	ABATERE MEDIE C _T	CV (%)
Genă de control ABL	C1	29,26	0,69	2,31
	C2	25,79	0,65	2,53
	C3	22,40	0,61	2,70
Gena de fuziune PML-RARA bcr1	F1	35,84	0,79	2,21
	F2	32,47	0,49	1,50
	F3	28,91	0,34	1,17
	F4	21,82	0,30	1,40
	F5	18,47	0,29	1,55

Valorile expresiilor transcripției FG PML-RARA bcr1

Tabelele 21 și 22 arată valorile expresiei transcripției FG PML-RARA bcr1 și CG ABL pentru linia celulară NB4, pacienții cu APL la diagnosticare și pentru pacienții cu substanță de control negativă.

Tabelul 21. Valorile expresiilor transcripției FG PML-RARA bcr1 și valorile CG – CT ABL

	Valori C _T (interval 95 %)	
	PML-RARA bcr1	ABL
Linie celulară NB4	24,7	23,7
Probe de la pacienți APL		
Măduvă osoasă (n = 14)	25,6 (23,1-27,5)	24,5 (21,7-28,5)
Sânge periferic (n = 9)	25,7 (23,7-29,4)	24,6 (22,0-27,4)
Probe de la pacienți negative		
Măduvă osoasă (n = 26)	–	25,35 (24,68-26,02)
Sânge periferic (n = 74)	–	25,15 (24,83-25,48)

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 de la pacienți diagnosticați cu APL.

Tabelul 22. Valorile expresiilor transcripției FG PML-RARA bcr1 și CG ABL – valori CN și NCN

	Valori CN (interval 95 %)		Valori NCN (interval 95 %)
	PML-RARA bcr1	ABL	CN bcr1/ CN ABL
Probe de la pacienți			
Măduvă osoasă (n = 14)	5129 (1480-25.704)	1538,7 (133,2-46.781,28)	0,30 (0,09-1,82)
Sânge periferic (n = 9)	3891 (475-14.454)	1400,76 (50,27-11.274)	0,36 (0,11-0,78)
Probe de la pacienți negative			
Măduvă osoasă (n = 26)	–	19.201 (12.922-25.480)	–
Sânge periferic (n = 74)	–	21.136 (17.834-24.437)	–

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 NB4, o linie celulară bine cunoscută pentru pozitivitatea sa pentru gena de fuziune PML-RARA bcr1; probe de la pacienți deja evaluate pentru pozitivitatea PML-RARA bcr1
- 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 efectuată 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 % (0/29)	0 % (0/28)	11 % (5/45)	5 % (5/100)

Referințe

1. Santamarie, C. et al. (2007) Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 92, 315.
2. Kern, W. et al. (2004) Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* 112, 4.
3. Lo-Coco, F. and Ammantuna, E. (2006) The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology ASH Educ. Program* 514, 156.
4. 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.
5. 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.
6. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 17, 1013.
7. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 20, 1925.

Simboluri

Pe ambalaj și pe etichete pot apărea următoarele simboluri:



<N>

Conține reactivi suficienți pentru <N> reacții



Data de expirare



Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro



Număr de catalog



Număr de lot



Număr de material (adică eticheta componente)



Numărul global de articol comercial (GTIN)



Limită de temperatură



Producător



Consultați instrucțiunile de utilizare

Istoricul revizuirilor documentului

R5, noiembrie 2017

Note adăugate cu privire la faptul că *ipsogen PML-RARA bcr1 Controls Kit*, nr. cat. 672091, este destinat exclusiv cercetării; erori minore de ortografie corectate.

Informații pentru comandă

Produs	Cuprins	Nr. cat.
<i>ipsogen PML-RARA bcr1 Kit</i> (24)	Pentru 24 de reacții: Standarde pentru gena de control ABL, standarde pentru gena de fuziune PML-RARA bcr1, amestec de soluție de amorsare și sondă ABL, amestec de soluție de amorsare și sondă genă de fuziune PML-RARA bcr1	672123
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

***ipsogen PML-RARA bcr1 Controls Kit* — pentru validarea calitativă a extracției ARN și transcripția inversă a genei de fuziune PML-RARA bcr1**

ipsogen PML-RARA bcr1 Controls Kit

Linii celulare cu expresie negativă, puternic și slab pozitivă a genei de fuziune PML-RARA bcr1

672091*

* *ipsogen PML-RARA bcr1 Controls Kit*, nr. cat. 672091, este destinat exclusiv cercetării. A nu se utiliza în proceduri de diagnosticare. Nicio afirmație sau declarație nu are scopul de a furniza informații pentru diagnosticarea, prevenția sau tratarea unei boli.

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* întrinesc 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®, Applied Biosystems®, 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 pentru *ipsogen PML-RARA bcr1 Kit*

Utilizarea acestui produs înseamnă acceptarea următorilor termeni de către orice cumpărător sau utilizator al produsului:

1. Produsul poate fi utilizat doar în conformitate cu protocoalele furnizate împreună cu produsul și prezentul manual și doar împreună cu componentele incluse în kit. QIAGEN nu acordă nicio licență pentru niciuna dintre proprietățile sale intelectuale în vederea utilizării sau încorporării componentelor incluse în această trusă cu orice componentă care nu este inclusă în această trusă, dacă nu este precizat astfel în protocoalele furnizate împreună cu produsul, în prezentul manual și în protocoalele suplimentare disponibile la adresa www.qiagen.com. Unele dintre aceste protocoale suplimentare au fost furnizate de utilizatorii QIAGEN pentru utilizatorii QIAGEN. Aceste protocoale nu au fost testate riguros sau optimizate de QIAGEN. QIAGEN nu le garantează și nici nu asigură faptul că acestea nu încalcă drepturile terților.
2. În afară de licențele acordate în mod explicit, QIAGEN nu garantează sub nicio formă că această trusă și/sau utilizarea (utilizările) acesteia 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 faptele 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 clauzele de licență actualizate, consultați www.qiagen.com.

HB-1358-005 1108718RO Nov-2017 © 2013-2017 QIAGEN, toate drepturile rezervate

