

2018. gada jūnijs

# *ipsogen*<sup>®</sup> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit rokasgrāmata



1. versija

**IVD**

Kvantitatīvā analīze in vitro diagnostikā

Izmantošanai ar Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM iekārtu

**CE**

**REF**

670923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724  
Hilden, VĀCIJA

R4 **MAT**

1114278LV

# Saturs

Paredzētais lietojums .....	5
Kopsavilkums un skaidrojums .....	5
Informācija par hronisko mieloleikozi .....	5
Slimības uzraudzība .....	6
Procedūras princips .....	8
Komplektā ietvertie materiāli .....	11
Komplekta saturs .....	11
Nepieciešamie materiāli, kas nav ietverti komplektā .....	12
Brīdinājumi un piesardzības pasākumi .....	15
Drošības informācija .....	15
Vispārējie piesardzības pasākumi .....	15
Reaģentu uzglabāšana un lietošana .....	17
Transportēšanas apstākļi .....	17
Uzglabāšanas apstākļi .....	18
Stabilitāte .....	18
Paraugu lietošana un uzglabāšana .....	19
Pilnasiņu paraugi .....	19
RNS paraugi .....	19
Procedūra .....	20
Eritrocītu līzes protokols kopējo leikocītu izolēšanai no pilnasinīm .....	20
Summārās RNS izolēšana .....	22
RNS kvalitatīvā un kvantitatīvā noteikšana .....	25

RNS koncentrācija .....	25
Atgriezeniskā transkripcija .....	28
Manuālā analīze: qPCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrumentā ar 72 stobriņu rotoru un RGQ programmatūru .....	31
Automatizētā analīze: qPCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrumentā ar 72 stobriņu rotoru un RGAM programmatūru .....	37
Rezultātu interpretācija RGQ Software (RGQ programmatūra).....	48
Datu analīzes princips .....	48
Uz neapstrādātiem datiem attiecināmās standartu līknes un kvalitātes kritēriji .....	50
Rezultātu interpretācija RGAM programmatūrā.....	58
Norādījumi par problēmu novēršanu .....	64
Kvalitātes kontrole .....	66
Ierobežojumi .....	66
Veiktspējas raksturojums.....	68
Tukšo paraugu robeža .....	68
Konstatēšanas robeža .....	68
Linearitāte .....	68
Atkārtojamība un reproducējamība .....	69
Interferējošas vielas .....	69
Klīniskā validācija un metožu salīdzinājums .....	70
Atbilstības pētījums: ERM-AD623 BCR-ABL1 vienas plazmīdas (IRMM) un <i>ipsogen</i> vienas plazmīdas (QIAGEN) standarts .....	72
Atsauces.....	74
Simboli.....	76
Informācija par pasūtīšanu .....	77

---

Rokasgrāmatas pārskatījumu vēsture .....	79
--	----

# Paredzētais lietojums

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ir kvantitatīvs in vitro diagnostikas tests, lai mērītu BCR-ABL1 apvienoto gēnu b3a2 (e14a2) un b2a2 (e13a2) transkriptus summārajā RNS, kas iegūta no pilnasinīm.

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ir paredzēts, lai uzraudzītu dziļo molekulāro reakciju pacientiem, kuriem diagnosticēta Filadelfijas hromosomu pozitīvās hroniskās fāzes (Ph+) p210 hroniskā mieloleikoze (HML).

To kalibrē saskaņā ar Pasaules veselības organizācijas (PVO) Starptautisko ģenētisko atsauces paneli (International Genetic Reference Panel).

## Kopsavilkums un skaidrojums

### Informācija par hronisko mieloleikozi

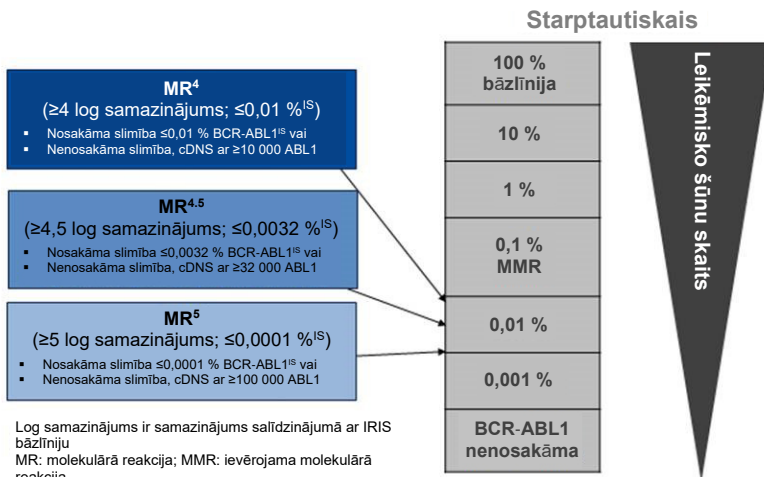
HML pieder pie mieloproliferatīvo neoplazmu grupas, un ir sastopama > 90 % gadījumu, ko raksturo Filadelfijas hromosomas (Philadelphia chromosome, Ph CHRS) klātbūtne. Šo hromosomu veido reciproka translokācija starp 9. un 22. hromosomas, t(9;22), garajiem pleciem, turklāt pārrāvumu klasteru reģions (BCR) atrodas 22. hromosomā un c-ABL onkogēns atrodas 9. hromosomā. Attiecīgais apvienotais gēns, BCR-ABL1 tiek transkribēts 8,5 kb mRNS kopā ar 2 krustojuma variantiem b2a2 (uzrādās 40 % gadījumu) un b3a2 (uzrādās 55 % gadījumu). Šis apvienotais gēns šifrē hibrīdu proteīnu p210 ar palielinātu tirozīnkināzes aktivitāti. b2a3 un b3a3 transkripti uzrādās mazāk nekā 5 % gadījumu. Pieaugušiem akūtas limfoblastiskās leukēmijas (ALL) pacientiem 35 % gadījumu var tikt novērota arī Ph hromosoma.

---

HML sastopamība gadā ir aptuveni 1–2 gadījumi uz 100 000 cilvēku, un HML veido 20 % no pieaugušo leukēmijām. Klīniski tā tiek izteikta kā pārmērīgs skaits mieloīdu šūnu, kas normāli diferencējas un funkcionē. HML pacienti 90–95 % gadījumu tiek diagnosticēti hroniskā vai stabilā slimības fāzē. Agrāk pacienti sasniedza paātrināto fāzi ar blastu krīzi un akūtu leukēmiju, kas vienmēr ir letāla, vidēji 4 līdz 6 gadu laikā. Tomēr imatiniba un pēdējā laikā arī otrās paaudzes tirozīnkināzes inhibitoru (Tyrosine Kinase Inhibitors, TKI) izmantošana ievērojami mainīja slimības ierasto gaitu. Lielākajai daļai pacientu tagad ir remisija, tādēļ viņiem ir nepieciešama ilgstoša novērošana un slimības uzraudzība.

## Slimības uzraudzība

Pašreizējais HML terapijas mērķis ir panākt 100 % izdzīvošanu un Ph hromosomas negatīvu rādītāju. Līdz ar to ir būtiska slimības uzraudzība, lai novērtētu atbildes reakciju uz ārstēšanu un pēc iespējas drīzāk noteiktu recidīvu katram pacientam. Veicot TKI terapiju, pacienti no hematoloģiskās remisijas parasti pāriet uz citoģenētisko un pēc tam — uz molekulāro remisiju ar atbilstošu leukēmisko šūnu un BBCR-ABL1 transkriptu skaita samazinājumu, kā norādīts 1. attēlā.



**MR<sup>4</sup>**  
(≥4 log samazinājums; ≤0,01 %<sup>IS</sup>)

- Nosakāma slimība ≤0,01 % BCR-ABL1<sup>IS</sup> vai
- Nenosakāma slimība, cDNS ar ≥10 000 ABL1

**MR<sup>4.5</sup>**  
(≥4,5 log samazinājums; ≤0,0032 %<sup>IS</sup>)

- Nosakāma slimība ≤0,0032 % BCR-ABL1<sup>IS</sup> vai
- Nenosakāma slimība, cDNS ar ≥32 000 ABL1

**MR<sup>5</sup>**  
(≥5 log samazinājums; ≤0,0001 %<sup>IS</sup>)

- Nosakāma slimība ≤0,0001 % BCR-ABL1<sup>IS</sup> vai
- Nenosakāma slimība, cDNS ar ≥100 000 ABL1

Log samazinājums ir samazinājums salīdzinājumā ar IRIS bāzīniju  
MR: molekulārā reakcija; MMR: ievērojama molekulārā reakcija

**1. Molekulārās reakcijas definīcija.** Pielāgots no 1., 2. un 9. atsauces. **MR:** molekulārā reakcija **MMR:** ievērojama molekulārā reakcija

Atsauces metode audzēja masas noteikšanai HML pacientiem ir kaulu smadzeņu (Bone Marrow, BM) metafāžu parastā citoģenētiskā analīze (G joslas). Citoģenētiskā reakcija tiek novērtēta vismaz 20 kaulu smadzeņu metafāzēs. Citoģenētiskās reakcijas līmenis tiek noteikts, ņemot vērā Ph hromosomas pozitīvo metafāžu procentuālo daudzumu (3). Tomēr šo novērtējumu ietekmē laboratorijas sniegums un ekspertīze, un tam ir zems jutīgums — 5 %, analizējot 20 metafāzes.

BCR-ABL1 Mbc r mRNS reāllaika kvantitatīvās polimerāzes ķēdes reakcijas (qPCR) kvantitatīvā noteikšana perifēro asiņu (peripheral blood, PB) paraugos nosaka molekulāro reakciju, un tagad tā ir daļa no izmantotajām HML slimības uzraudzības metodēm. Šī metode nav tik invazīva kā standarta kaulu smadzeņu metafāžu citoģenētika, turklāt tā ir jutīgāka.

Nesen tika atjaunināti arī ieteikumi par HML slimības uzraudzību, lai iekļautu jaunus klīniskos pierādījumus, kas iegūti no zāļu izmēģinājumiem, otrās paaudzes TKI augstākas klīniskās efektivitātes, kā arī BCR-ABL1 kvantitatīvās noteikšanas tehniskos uzlabojumos, kas kopā uzlabo slimības uzraudzības mērķus. Proti, otrās paaudzes TKI izraisa nozīmīgāku molekulāro reakciju lielam skaitam HML pacientu, sasniedzot to, ko definē kā dziļo molekulāro reakciju, un tas atbilst BCR-ABL1 slodzei zem 0,01 % (MR4.0) vai 0,0032 % (MR4.5) Spēja precīzi kvantitatīvi noteikt šo ļoti zemo BCR-ABL1 slodzes līmeni var būt klīniski nozīmīga, jo novērojumu izmēģinājumos ir pierādīts, ka TKI var droši pārtraukt pacientiem ar ilgstošu MR4.5 molekulāro atbildes reakciju (4). Tomēr tiek veikti papildu klīniskie pētījumi, lai apstiprinātu šos konstatējumus.

Jaunākos ieteikumus par atbildes reakcijas definēšanu un HML pacientu uzraudzību attiecībā uz TKI sniedz ELN (European Leukaemia Net — Eiropas Leikozes tīkls) eksperti (3).

Tehniskajā ziņā starptautiskie eksperti ir centušies saskaņot BCR-ABL1 Mbcr testēšanu un ziņošanu (5–7). Turklāt nesen PVO aizbildnībā tika apstiprināts atsaucēs panelis, lai varētu vienkārši standartizēt BCR-ABL1 kvantitatīvo noteikšanu (8).

## Procedūras princips

qPCR ļauj precīzi noteikt PCR produktu daudzumu PCR amplifikācijas procesa eksponenciālajā fāzē. qPCR datus var ātri iegūt bez PCR pēcapstrādes, veicot reāllaika fluorescējošo signālu noteikšanu PCR ciklošanas laikā un/vai pēc tās, tādējādi ievērojami samazinot PCR produkta kontaminācijas risku. Pašlaik ir pieejami trīs galvenie qPCR metožu veidi: qPCR analīze, izmantojot SYBR® Green I Dye, qPCR analīze, izmantojot hidrolīzes zondes, un qPCR analīze, izmantojot hibridizācijas zondes.

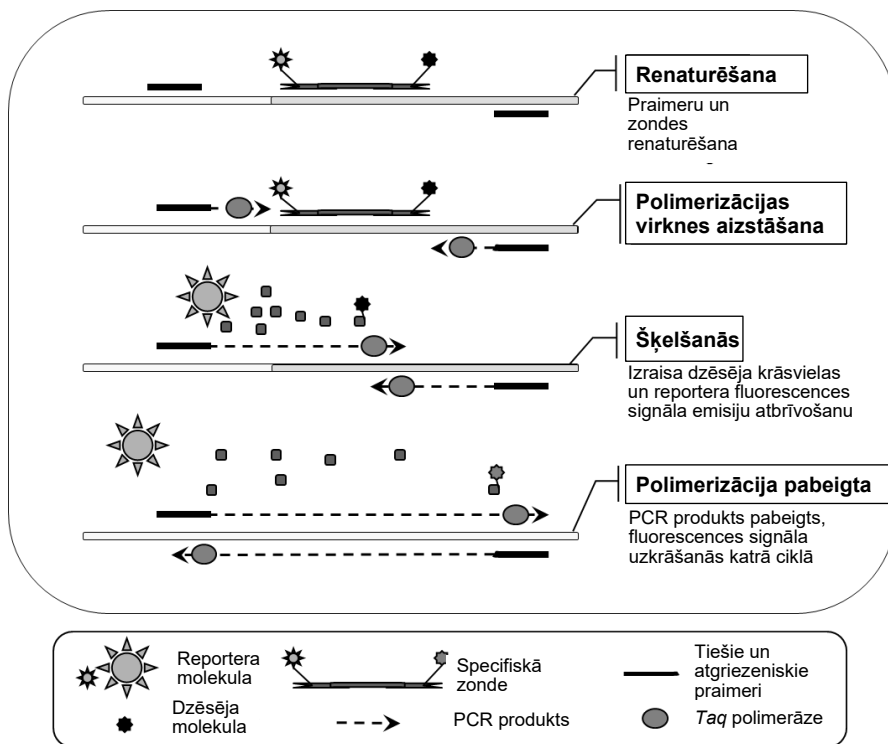


---

Šajā analizē tiek izmantots qPCR divu krāsvielu oligonukleotīdu hidrolīzes princips. PCR laikā tiešie un atgriezeniskie praimerī hibridizējas ar noteiktu sekvenci. Tajā pašā maisījumā ir divu krāsvielu oligonukleotīds. Šī zonde, kuras sastāvā ir oligonukleotīds, kas ir iezīmēts ar 5' reportera krāsvielu un pakārtotu 3' dzēsēja krāsvielu, hibridizējas ar mērķa sekvenci PCR produktā. qPCR analīze ar hidrolīzes zondēm izmanto *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNS polimerāzes 5'→3' eksonukleāzes aktivitāti. Ja zonde ir neskarta, reportera krāsvielas tuvums dzēsēja krāsvielai izraisa reportera fluorescences slāpēšanu, galvenokārt Förster tipa enerģijas pārnesei dēļ.

Ja PCR laikā ir pieejams interesējošais mērķis, zonde normalizējas īpaši starp tiešā un atgriezeniskā praimera vietām. DNS polimerāzes 5'→3' eksonukleāzes aktivitāte sašķēļ zondi starp reporteru un dzēsēju tikai tad, ja zonde hibridizējas ar mērķi. Pēc tam zondes fragmenti tiek pārvietoti no mērķa un turpinās virknes polimerizācija. Zondes 3' gals tiek bloķēts, lai novērstu zondes pagarināšanos PCR laikā (2. attēls). Šis process notiek katrā ciklā, un tas nekavē eksonenciālu produkta uzkrāšanos.

Fluorescences signāla pieaugums tiek noteikts tikai tad, ja mērķa sekvence ir komplementāri saistīta ar zondi un tādējādi tiek amplificēta PCR laikā. Šo prasību dēļ nespecifiskā amplifikācija netiek konstatēta. Līdz ar to fluorescences pieaugums ir tieši proporcionāls mērķa amplifikācijai PCR laikā.



**2. Reakcijas princips.** Summārajai RNS tiek veikta atgriezeniskā transkripcija, un PCR amplificē ģenerēto cDNS, izmantojot specifisku praimeru pāri un specifisku iekšējo divu krāsvielu zondi (FAM™–BHQ®-1). Katras PCR normalizācijas darbības laikā zonde saistās ar amplikonu. Kad *Taq* pagarinās no amplikonam piesaistītā praimera, tā nobīda zondes 5' galu, kuru pēc tam noārda *Taq* DNS polimerāzes 5'→3' eksonukleāzes aktivitāte. Šķelšanās turpinās, līdz atlikusī zonde izkausē amplikonu. Šis process šķīdumā atbrīvo fluoroforu un dzēsēju, telpiski tos atdalot un līdz ar to izraisot FAM fluorescences pieaugumu un BHQ-1 fluorescences samazinājumu.

# Komplektā ietvertie materiāli

## Komplekta saturs

<b>ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Kataloga Nr.</b>		<b>670923</b>
<b>Reakciju skaits</b>		<b>24</b>
<b>Atgriezeniskai transkripcijai (reverse transcription, RT) paredzētie reaģenti</b>		24 µl
Apgrieztā transkriptāze	Violeta	100 µl
RT Mix (RT maisījums)	Violeta	300 µl
<b>Kalibrēšanai paredzēti reaģenti</b>		
High Positive RNA Control (Augsti pozitīva RNS kontrole)	Balta	15 µl x 3
Low Positive RNA Control (Zemi pozitīva RNS kontrole)	Balta	15 µl x 3
IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators)	Balta	15 µl x 3
SP1-BCR-ABL MbcR un ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (MbcR un ABL1 vienas plazmīdas standarta atšķaidījums) ( $10^1$ kopijas/5 µl)	Dzeltena	35 µl
SP2-BCR-ABL MbcR un ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (MbcR un ABL1 vienas plazmīdas standarta atšķaidījums) $10^2$ kopijas/5 µl)	Dzeltena	35 µl
SP3-BCR-ABL MbcR un ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (MbcR un ABL1 vienas plazmīdas standarta atšķaidījums) ( $10^3$ kopijas/5 µl)	Dzeltena	70 µl
SP4-BCR-ABL MbcR un ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (MbcR un ABL1 vienas plazmīdas standarta atšķaidījums) ( $10^4$ kopijas/5 µl)	Dzeltena	35 µl
SP5-BCR-ABL MbcR un ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (MbcR un ABL1 vienas plazmīdas standarta atšķaidījums) ( $10^5$ kopijas/5 µl)	Dzeltena	70 µl
SP6-BCR-ABL MbcR un ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (MbcR un ABL1 vienas plazmīdas standarta atšķaidījums) ( $10^6$ kopijas/5 µl)	Dzeltena	70 µl

Tabulas turpinājums nākamajā lappusē

Tabulas turpinājums no iepriekšējās lappuses

<b>qPCR paredzēti reaģenti</b>		
Taq DNS polimerāze	Piparmētru	85 µl
qPCR Mix ABL1*	Zaļa	720 µl x 3
qPCR Mix Mbcrr	Sarkana	720 µl x 3
ipsogen <i>BCR-ABL1 Mbcrr RGQ RT-PCR rokasgrāmata</i>		1

\* Satur ABL1 kontrolgēnam paredzētu maisījumu no specifiskiem atgriezeniskiem un tiešiem prameriem un specifisku FAM-BHQ-1 zondi.

† Satur BCR-ABL1 Mbcrr apvienotajam gēnam paredzētu maisījumu no specifiskiem atgriezeniskiem un tiešiem prameriem un specifisku FAM-BHQ-1 zondi.

## Nepieciešamie materiāli, kas nav ietverti komplektā

Strādājot ar ķīmikālijām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai iegūtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (Safety Data Sheet, SDS), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

### Eritrocītu līzei paredzēti reaģenti

- Erythrocyte Lysis (EL) Buffer (Eritrocītu līzes (EL) buferšķīdums) (kat. Nr. 79217)
- 14.3 M β-merkaptetoanols\*
- RNeasy® Midi Kit (kat. Nr. 75144)

\* Ieteicamās ķīmiskās vielas un aprīkojums eritrocītu līzei un RNS izolēšanai var būt potenciāli bīstams. Nodrošiniet, lai pirms lietošanas tiktu noteikti attiecīgi individuālie aizsardzības līdzekļi un aizsardzības pasākumi.

## Reāģenti summārās RNS izolēšanai

- RNeasy Midi Kit (kat. Nr. 75144)
- Etanols (70 %, 80 % un 96–100 %)
- RNS attīrīšanas un koncentrācijas darbība: RNeasy MinElute® Cleanup Kit (kat. Nr. 74204)
- PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes

## Izejmateriāli

- Nukleāzi nesaturoši, pret aerosolu izturīgi, sterili PCR pipešu uzgaļi ar hidrofobiem filtriem
- 18–20 kalibra adata\* uz šļirces bez RNase
- 0,5 ml vai 0,2 ml nukleāzi nesaturoši stobriņi
- 1,5 ml vai 2 ml nukleāzi nesaturoši stobriņi
- 50 ml centrifūgas stobriņi
- Teststrēmeļu stobriņi un vāciņi, 0,1 ml, paredzēti Rotor-Gene Q (kat. Nr. 981103 vai 981106)
- Ledus

## Aprīkojums

- Pipetes\*, kas paredzētas PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Galda centrifūga\* ar rotoru 0,2 ml un 2 ml reakcijas stobriņiem (ar centrifugēšanas jaudu 8000 x g vai 10 000 apgr./min)
- Spektrofotometrs\*

\* Nodrošiniet, lai instrumenti tiktu pārbaudīti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

- Laboratorijas centrifūga\* ar rotoru, kas paredzēta 15 un 50 ml stobriņiem (piemēroti 3000–5000 x g), kas ļauj veikt atdzesētu centrifugēšanu (4 °C)
- Ierīce Thermomixer, sildāms orbitāls inkubators, sildīšanas bloks vai ūdens pelde (atgriezeniskās transkripcijas darbībai)\*
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM\* (kat. Nr. 9002032) un saistītais specifiskais materiāls  
**Piezīme.** Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM nevar izmantot atgriezeniskās transkripcijas darbībai.

## Aprīkojums, paredzēts qPCR ar manuālu analīzi

### Rotor-Gene Q programmatūras versija 2.1.0 vai jaunāks aprīkojums, kas paredzēts qPCR ar automatizētu analīzi

- Rotor-Gene AssayManager® programmatūras versija 2.1.x (x≥0)
- Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in v1.0.x (x≥0)
- Analīzes profils ipsogen\_BCR-ABL1Mbc(ABL)\_blood\_CE\_V1\_0\_x.iap (x≥1)

# Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

Lietošanai in vitro diagnostikā

## Drošības informācija

Strādājot ar ķīmikālijām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Plašāku informāciju skatiet attiecīgajās drošības datu lapās (Safety Data Sheet, SDS). Tās ērtā un kompaktā PDF formātā ir pieejamas vietnē **[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)**, kur ir pieejamas SDS skatīšanai un izdrukāšanai katram QIAGEN® komplektam un tā komponentiem.

Visas ķīmiskās vielas un bioloģiskie materiāli ir potenciāli bīstami. Paraugi ir potenciāli infekciozi, un ar tiem ir jārīkojas kā ar bioloģiski bīstamiem materiāliem. Asinis tiek uzskatītas par potenciāli infekciozām. Strādājot ar pilnasinīm, jāveic visi nepieciešamie piesardzības pasākumi, ko ieteikusi atbilstoša regulatīvā iestāde lietošanas valstī.

Ieteicamās ķīmiskās vielas un aprīkojums eritrocītu līzei un RNS izolēšanai var būt potenciāli bīstams. Nodrošiniet, lai pirms lietošanas tiktu noteikti attiecīgi individuālie aizsardzības līdzekļi un aizsardzības pasākumi.

## Vispārējie piesardzības pasākumi

Lai izmantotu qPCR testus, ir nepieciešama laba laboratorijas prakse, tostarp tāda aprīkojuma apkope, kas ir paredzēts molekulārajai bioloģijai un atbilst piemērojamajiem noteikumiem un attiecīgajiem standartiem. Šā produkta komponenti ir pietiekami, lai katrā analīzē veiktu 24 reakcijas.

- Utilizējiet paraugus un analīzes atkritumus atbilstoši vietējām drošības procedūrām.
- Reaģenti, kas iekļauti *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit, ir optimāli atšķaidīti. Neatšķaidiet reaģentus papildus, jo tas var izraisīt veikspējas zudumu.
- Visus *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit komplektā iekļautos reaģentus ir paredzēts lietot tikai ar citiem tā paša komplekta reaģentiem. Neaizstājiet nevienu reaģentu ar reaģentu no cita *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit komplekta, jo tas var ietekmēt veikspēju.
- Papildu brīdinājumus, piesardzības pasākumus un procedūras skatiet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrumenta, Rotor-Gene AssayManager v2.1 un Gamma spraudņa lietotāja rokasgrāmatās.
- Inkubācijas laika un/vai temperatūras maiņa var radīt kļūdainus vai pretrunīgus datus.
- Neizmantojiet nederīgus vai nepareizi uzglabātus komponentus.
- Ievērojiet īpašu piesardzību, lai novērstu savstarpēju kontamināciju, izmantojot pozitīvās kontroles.
- Ievērojiet īpašu piesardzību, lai nepieļautu cDNS vai PCR produkta pārneses kontamināciju, kuras dēļ var rasties aplami pozitīvs signāls.
- Ievērojiet īpašu piesardzību, lai novērstu RNase vai DNase kontamināciju, kas var izraisīt matricas RNS vai cDNA noārdīšanos.
- Atveriet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrumentu tikai tad, kad ir pabeigta izpilde.
- Jāievēro piesardzība, lai nodrošinātu pareizu paraugu testēšanu, īpaši piesargoties no nepareizas paraugu ievadīšanas, ielādes kļūdām un pipetēšanas kļūdām.
- Nodrošiniet, lai darbs ar paraugiem notiktu sistemātiski, lai tos vienmēr varētu pareizi identificēt un uzturētu izsekojamību.



Tādēļ ieteicams ievērot tālāk sniegtos norādījumus.

- Izmantojiet laboratorijas aprīkojumu bez nukleāzes (piem., pipešu uzgaļus, reakcijas flakonus)
- Lai izvairītos no paraugu un reaģentu savstarpējās kontaminācijas, visās pipetēšanas darbībās izmantojiet jaunus pipešu uzgaļus, kas ir izturīgi pret aerosolu.
- Sagatavojiet pirms-PCR pamatmaisījumus ar tiem paredzētajiem materiāliem (pipetēm, uzgaļiem utt.) tam paredzētajā vietā, kur nav nevienas DNS matricas (cDNS, plazmīdas vai PCR produktu).
- Pievienojiet matricu atsevišķā zonā (vēlams atsevišķā telpā) ar specifisku materiālu (pipetēm, uzgaļiem utt.).

Drošības informāciju, kas raksturīga reaģentiem un komplektiem, kurus izmanto paraugu sagatavošanai, skatiet attiecīgajās rokasgrāmatās. Drošības informācija par *RNeasy Midi Kit* (kat. Nr. 75144) apvienojumā ar *Buffer EL* (kat. Nr. 79217) ir sniegta *RNeasy Midi/Maxi rokasgrāmatā*, savukārt *RNeasy MinElute Cleanup Kit* (kat. Nr. 74204) drošības informācija ir sniegta *RNeasy MinElute Cleanup rokasgrāmatā*.

## Reaģentu uzglabāšana un lietošana

### Transportēšanas apstākļi

Komplekts *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* tiek piegādāts uz sausā ledus. Ja kāds no *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* komplekta komponentiem piegādes brīdī nav sasaldēts, ja ārējais iepakojums transportēšanas laikā ir atvērts vai sūtijumā nav ietverta piezīme par iepakojumu vai reaģenti, sazinieties ar QIAGEN tehniskā atbalsta dienestu vai vietējiem izplatītājiem (skatiet aizmugurējo vāku vai apmeklējiet vietni [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Uzglabāšanas apstākļi

Komplekts *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit tūlīt pēc saņemšanas jāuzglabā no –30 °C līdz –15 °C temperatūrā saldētavā, kas uztur nemainīgu temperatūru. Jāuzmanās, lai qPCR maisījumus pasargātu no gaismas.

Uzglabāšanas informācijai attiecībā uz reaģentiem un komplektiem, ko izmanto paraugu sagatavošanai: RNeasy Midi Kit (kat. Nr. 75144), Buffer EL (kat. Nr. 79217), RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat. Nr. 74204), skatiet atbilstošās rokasgrāmatas.

## Stabilitāte

Uzglabājot norādītajos uzglabāšanas apstākļos, *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit komplekts ir stabils līdz derīguma termiņa datumam.

Pēc atvēršanas reaģentus var uzglabāt to oriģinālajā iepakojumā no –30 līdz –15 °C temperatūrā līdz derīguma termiņa datumam, kas norādīts uz iepakojuma. Sasaldēšanas un atkausēšanas ciklu nedrīkst veikt vairāk nekā piecas reizes.

Stabilitātes informācija attiecībā uz reaģentiem un komplektiem, ko izmanto paraugu sagatavošanai: RNeasy Midi Kit (kat. Nr. 75144), Buffer EL (kat. Nr. 79217), RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat. Nr. 74204), skatiet atbilstošās rokasgrāmatas.

# Paraugu lietošana un uzglabāšana

Komplekts *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ir paredzēts lietošanai ar RNS paraugiem, kas iegūti no pilnasinīm. Visi paraugi jāuzskata par potenciāli bīstamiem.

## Pilnasiņu paraugi

- Pilnasiņu paraugus pirms RNS ekstrahēšanas nepieciešams antikoagulēt ar kāliju EDTA (K<sub>2</sub>-EDTA) un glabāt 2–8 °C temperatūrā ne ilgāk kā 4 dienas.
- Nelietojiet sasaldētas asinis.
- Marķējiet, pārvietojiet un uzglabājiet asins paraugus kontrolētā veidā saskaņā ar vietējām procedūrām.

**Piezīme.** Pilnasiņu paraugu sūtīšanai ir jānotiek tādos pašos apstākļos kā glabāšanai, lai izvairītos no temperatūras izmaiņām.

## RNS paraugi

- Pēc izolēšanas attīrītu RNS var uzglabāt no –30 °C līdz –15 °C temperatūrā vai zemākā temperatūrā (no –90 °C līdz –65 °C), ja nepieciešama ilgstoša uzglabāšana.
- Marķējiet, pārvietojiet un uzglabājiet RNS paraugus kontrolētā veidā saskaņā ar vietējām procedūrām.

**Piezīme.** RNS paraugu sūtīšanai ir jānotiek tādos pašos apstākļos kā glabāšanai, lai izvairītos no temperatūras izmaiņām glabāšanas un sūtīšanas laikā.

# Procedūra

Summārā RNS jāattīra no 10 ml EDTA stobriņos savāktām perifērajām pilnasinīm.

- Pārlicinieties, vai nav beidzies eritrocītu līzei, RNS izolēšanai un RNS koncentrācijai izmantojamo reaģentu derīguma termiņš un vai tie ir transportēti un uzglabāti pareizi.
- Izmantojiet RNeasy Midi Kit (kat. Nr. 75144) un Buffer EL eritrocītu līzei (kat. Nr. 79217), kas paredzēta RNS izdalīšanai no perifērajām pilnasinīm.

## Eritrocītu līzes protokols kopējo leukocītu izolēšanai no pilnasinīm

Šis protokols ir paredzēts kopējo leukocītu izolēšanai no 10 ml cilvēka pilnasinīm, izmantojot Buffer EL (kat. Nr. 79217).

**Piezīme.** Šis protokols nav paredzēts lietošanai sasaldētiem pilnasiņu paraugiem.

## Svarīgas piezīmes pirms darba sākšanas

- Visu cilvēku asinis un ķermeņa šķidrums tiek uzskatīti par potenciāli infekcioziem. Strādājot ar pilnasinīm, jāveic visi nepieciešamie piesardzības pasākumi, ko ieteikusi atbilstoša regulatīvā iestāde lietošanas valstī.
- Buffer RLT glabāšanas laikā var rasties nogulsnes. Ja nepieciešams, izšķīdiniet uzsildot un pēc tam atstājiet istabas temperatūrā.
- Eritrocītu līzes darbība jāveic uz ledus.
- Šī protokola 3. un 5. centrifugēšanas darbība jāveic 4 °C temperatūrā standarta laboratorijas centrifūgā.

## Pirms darba sākšanas veicamās darbības

- Sagatavojiet Buffer RLT (piegādāts komplektā RNeasy Midi Kit), pievienojot  $\beta$ -merkaptoetanolu ( $\beta$ -ME): pievienojiet 10  $\mu$ l  $\beta$ -ME uz 1 ml Buffer RLT.
- Pēc  $\beta$ -ME pievienošanas Buffer RLT ir stabils 1 mēnesi.

**Piezīme.**  $\beta$ -ME ir toksisks; pievienojiet velkmes skapī un valkājiet atbilstošu aizsargapģērbu.

**Piezīme.** Buffer RLT satur guanidīna tiocianātu, kurš ar balinātāju var veidot augsti reaktīvus savienojumus. Paraugu savienošanas atkritumiem nedrīkst tieši pievienot balinātāju vai skābju šķīdumus.

## Procedūra

1. Pievienojiet 40 ml Buffer EL pie 10 ml pilnasinīm atsevišķā 50 ml centrifūgas stobriņā. Samaisiet, īsi apgriežot.

2. Inkubējiet 15 minūtes uz ledus. Samaisiet, inkubācijas laikā divas reizes īsi apgriežot.

**Piezīme.** Duļķainā suspensija inkubācijas laikā kļūst caurspīdīga, kas liecina par eritrocītu līzi.

3. Centrifugējiet 10 minūtes ar ātrumu  $400 \times g$  4 °C temperatūrā. Pilnībā atbrīvojieties no supernatanta. Saglabājiet leikocītu granulu.

**Piezīme.** Leikocīti pēc centrifugēšanas veidos granulu. Nodrošiniet pilnīgu supernatanta noņemšanu. Tālākajās darbībās tiek izvadīti nelieli eritrocītu daudzumi, kas varētu saglabāties.

Nepilnīga supernatanta noņemšana var kavēt līzi un izšķīdināt lizātu, tādējādi ietekmējot apstākļus, kuros RNS saistās ar RNeasy membrānu. Abi efekti var samazināt RNS daudzumu.

4. Pievienojiet 20 ml Buffer EL leikocītu granulai un atkārtoti suspendējiet, pipetējot uz augšu un uz leju.

5. Centrifugējiet 10 minūtes ar ātrumu  $400 \times g$   $4^\circ\text{C}$  temperatūrā. Pilnībā atbrīvojieties no supernatanta. Saglabājiet leikocītu granulu.

**Piezīme.** Tālākās centrifugēšanas darbības (piem., RNS izolēšana) jāveic  $20\text{--}25^\circ\text{C}$  temperatūrā.

6. Atbrīvojiet leikocītu granulu, apgriežot mēģeni 4 ml Buffer RLT, kas papildināts ar  $\beta$ -ME. Izmantojiet virpuļmaisītāju vai pipetējiet, lai samaisītu.

**Piezīme.** Nodrošiniet, lai  $\beta$ -ME tiktu pievienots Buffer RLT pirms lietošanas.

7. Nodrošiniet izšķīšanu, izmantojot parasto rotora-statora homogenizatoru, vismaz 45 sekundes ar pilnu ātrumu, līdz paraugs ir vienmērīgi homogēns. Vai arī 10 sekundes apstrādājiet virpuļmaisītājā paraugu un vismaz 10 reizes izvadiet lizātu caur 18-20. kalibra adatu, kas pievienota šļircei bez RNase.

**Piezīme.** Nepilnīga izšķīšana ievērojami samazinās daudzumus, nosprostojojot RNeasy kolonnu. Izšķīšana ar rotora-statora homogenizatoru parasti rada lielāku summārās RNS daudzumu salīdzinājumā ar citām homogenizācijas metodēm.

**Piezīme.** Pēc izšķīšanas paraugus var glabāt no  $-90^\circ\text{C}$  līdz  $-65^\circ\text{C}$  līzes buferšķīdumā. Saldēti paraugi ir stabili mēnešiem ilgi.

## Summārās RNS izolēšana

Šis protokols ir paredzēts summārās šūnu RNS izolēšanai no homogenizēta leikocīta lizāta, kas atkārtoti suspendēts 4 ml RLT/ $\beta$ -ME.

### Svarīgas piezīmes pirms darba sākšanas

- DNase noārdīšanās nav nepieciešama, jo RNeasy silīcija dioksīda membrānas tehnoloģija efektīvi noņem lielāko daļu DNS.
- Buffer RLT un Buffer RW1 satur guanidīna sāli, tāpēc tie nav saderīgi ar dezinfekcijas reaģentiem, kas satur balinātāju. Guanidīns ir kairinātājs. Ievērojiet attiecīgos piesardzības pasākumus un, veicot apstrādi, valkājiet cimdus.

- RNeasy protokols jāveic istabas temperatūrā. Izpildot procedūru, rīkojieties ātri.
- Visas konfigurēšanas darbības tiek veiktas 20–25 °C temperatūrā. Nodrošiniet, lai centrifūga neatdzistu zem 20 °C.
- Katrā centrifugēšanas posmā visam tilpumam jāiziet cauri kolonnai. Iespējams, ka centrifugēšanu nepieciešams atkārtot.

## Pirms darba sākšanas veicamās darbības

- Ja nepieciešams, pirms RNS izolēšanas protokola sākšanas atkausējiet leikocītu lizātu istabas temperatūrā.
- Sagatavojiet 4 ml 70 % etanola vienam paraugam.
- RPE Buffer tiek piegādāts koncentrāta veidā. Pirms pirmās lietošanas reizes pievienojiet 4 tilpumus etanola (96–100 %), kā norādīts uz pudeles, lai iegūtu darba šķīdumu.

## Procedūra

1. Lizātam pievienojiet 4 ml 70 % etanola un rūpīgi samaisiet, enerģiski kratot. Necentrifugējiet.

**Piezīme.** Pēc etanola pievienošanas var veidoties redzamas nogulsnes. Izšķīdiniet nogulsnes pilnībā, enerģiski kratot, un nekavējoties ķerieties pie 2. darbības. Nepietiekama nogulšņu izšķīšana var izraisīt DNS piesārņojumu, kā rezultātā summārās RNS paraugs ir netīrs.

2. Paragu, ieskaitot nogulsnes, kas var būt izveidojušās, uzklāj uz RNeasy Midi Column, kas ievietota 15 ml centrifūgas stobriņā (iekļauts komplektā). Saudzīgi aizveriet stobriņu un 5 minūtes centrifugējiet ar 4000 x g. Izmetiet caurplūdes materiālu.

**Piezīme.** Maksimālais katra stobriņa uzpildīšanas tilpums ir 4 µl. Ja tilpums pārsniedz 4,0 ml, pēc kārtas ievietojiet alikvotus RNeasy Column un centrifugējiet, kā norādīts iepriekš. Pēc katras centrifugēšanas darbības izmetiet caurplūdes materiālu.

Atkārtoti izmantojiet centrifūgas stobriņu 3. darbībā.

3. Pievienojiet 4 ml Buffer RW1 kolonnai RNeasy Column. Saudzīgi aizveriet centrifūgas stobriņu un centrifugējiet 5 minūtes pie 4000 x g, lai noskalotu kolonnu. Izmetiet caurplūdes materiālu.

**Piezīme.** Caurplūdes materiāls satur Buffer RLT vai Buffer RW1, tāpēc tas nav saderīgs ar balinātāju.

Atkārtoti izmantojiet centrifūgas stobriņu 4. darbībā.

4. Pievienojiet 2,5 ml Buffer RPE kolonnai RNeasy Column. Saudzīgi aizveriet centrifūgas stobriņu un centrifugējiet 2 minūtes pie 4000 x g, lai noskalotu kolonnu.

**Piezīme.** Buffer RPE tiek piegādāts koncentrāta veidā. Nodrošiniet, lai pirms lietošanas Buffer RPE tiktu pievienots etanols.

Atkārtoti izmantojiet centrifūgas stobriņu 5. darbībā. Caurplūdes materiāls nav jāizmet.

5. Pievienojiet papildu 2,5 ml Buffer RPE kolonnai RNeasy Column. Saudzīgi aizveriet centrifūgas stobriņu un centrifugējiet 5 minūtes pie 4000 x g, lai nožāvētu RNeasy silikongela membrānu

**Piezīme.** Ir svarīgi nožāvēt RNeasy membrānu, jo atlikušais etanols var traucēt pakārtotās reakcijas. Šī centrifugēšana nodrošina, ka eluēšanas laikā netiek pārnesti etanols.

**Piezīme.** Pēc centrifugēšanas uzmanīgi izņemiet RNeasy kolonnu no centrifūgas stobriņa, lai kolonna nesaskartos ar caurplūdes materiālu, jo tādējādi tiks pārnesti etanols.

6. Lai eluētu, pārvietojiet RNeasy Column uz jaunu 15 ml savākšanas stobriņu (iekļauts komplektācijā). Pipetējiet 200 µl ūdens bez RNase tieši uz RNeasy silikongela membrānas. Saudzīgi aizveriet stobriņu. Ļaujiet tam pastāvēt 1 minūti un pēc tam 3 minūtes centrifugējiet ar 4000 x g.
7. Atkārtojiet eluēšanas darbību (6. darbība), izmantojot eluātu 6. darbībā un pēc tam 5 minūtes centrifugējiet ar 4000 x g.

**Piezīme.** Ilgtermiņā RNS var glabāt no –90 °C līdz –65 °C temperatūrā.



## RNS kvalitatīvā un kvantitatīvā noteikšana

Analīzes kvalitāte ir lielākoties atkarīga no izmantojamās RNS kvalitātes. Mēs iesakām pirms analīzes analizēt attīrīto RNS ar agarozes gela elektroforēzi vai spektrofotometriju.

- Spektrofotometra kalibrēšanai jāizmanto tukšs PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes paraugs.
- OD 1,0 pie 260 nm ir ekvivalents aptuveni 40 µg/ml vienas virknes RNS.
- OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> attiecība starp 1,8 un 2,1 norāda uz augsti attīrītu RNS.

Lai izpildītu RT darbību, nepieciešamā RNS koncentrācija ir 200 ng/µl. Ja RNS koncentrācija eluātā ir mazāka par 200 ng/µl, RNS koncentrācija eluātā jāpalielina, izmantojot RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN, kat. Nr. 74204).

Ja RNS koncentrācija eluātā pārsniedz augšējo diapazona robežu, koncentrācija jāpielāgo līdz 200 ng/µl ar ūdeni bez RNase.

**Piezīme.** Pārbaudiet RNS koncentrāciju pēc normalizācijas.

## RNS koncentrācija

Šis protokols ir optimizēts RNS koncentrācijai.

### Svarīgas piezīmes pirms darba sākšanas

- DNase noārdīšanās nav nepieciešama, jo RNeasy MinElute silīcija dioksīda membrānas tehnoloģija efektīvi noņem lielāko daļu DNS.
- Buffer RLT satur guanidīna sāli, tāpēc tas nav saderīgs ar dezinfekcijas reaģentiem, kas satur balinātāju.
- Izpildiet visas procedūras darbības istabas temperatūrā (15–25 °C). Izpildot procedūru, rīkojieties ātri.

- Visas centrifugēšanas darbības veiciet standarta mikrocentrifūgā istabas temperatūrā 20–25 °C. Nodrošini, lai centrifūga neatdzistu zem 20 °C.
- Buffer RLT uzglabāšanas laikā var veidot nogulsnes. Ja nepieciešams, izšķīdiniet uzsildot un pēc tam atstājiet istabas temperatūrā (15–25 °C).

## Pirms darba sākšanas veicamās darbības

- Sagatavojiet 500 µl 80 % etanola katram RNS paraugam, kam jāveido koncentrācija.
- Buffer RPE tiek piegādāts koncentrāta veidā. Pirms pirmās lietošanas reizes pievienojiet 4 tilpumus etanola (96–100 %), kā norādīts uz pudeles, lai iegūtu darba šķīdumu.
- Pirms sākšanas iestatiet kolonnas istabas temperatūrā.
- Izmēriet apstrādājamo paraugu tilpumu un pielāgojiet tā, lai galīgais parauga tilpums būtu 200 µl.

## Procedūra

1. Pēc parauga pielāgošanas līdz 200 µl tilpumam ar ūdeni bez RNase pievienojiet 700 µl Buffer RLT un labi samaisiet.
2. Atšķaidītajai RNS pievienojiet 500 µl 96-100 % etanola un labi samaisiet pipetējot. Necentrifugējiet. Nekavējoties turpiniet ar 3. darbību.
3. Pārnēsiet ne vairāk kā 700 µl parauga uz RNeasy MinElute Spin Column, kas ievietota 2 ml parauga ņemšanas stobriņā (iekļauts komplektācijā). Saudzīgi aizveriet vāku un 15 sekundes centrifugējiet ar  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10\,000$  apgr./min). Izmetiet caurplūdes materiālu. Pārnēsiet visu atlikušo paraugu (līdz 700 µl) un atkārti centrifugēšanu. Izmetiet caurplūdes materiālu.

**Piezīme.** Caurplūdes materiāls satur Buffer RLT, tāpēc tas nav saderīgs ar balinātāju. Drošības informāciju skatiet "Brīdinājumi un piesardzības pasākumi", 15.

4. Ievietojiet RNeasy MinElute Spin Column jaunā 2 ml parauga ņemšanas stobriņā (iekļauts komplektācijā).
5. Rotācijas kolonnā pievienojiet 500 µl Buffer RPE. Saudzīgi aizveriet vāku un 15 sekundes centrifugējiet ar  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10\,000$  apgr./min), lai noskalotu rotācijas kolonnas membrānu. Izmetiet caurplūdes materiālu.

**Piezīme.** Buffer RPE tiek piegādāts koncentrāta veidā. Nodrošiniet, lai pirms lietošanas Buffer RPE tiktu pievienots etanols.

Atkārtoti izmantojiet parauga ņemšanas stobriņu 6. darbībā.

6. Pievienojiet 500 µl 80 % etanola RNeasy MinElute Spin Column. Saudzīgi aizveriet vāku un 2 minūtes centrifugējiet ar  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10\,000$  apgr./min), lai noskalotu rotācijas kolonnas membrānu. Izmetiet caurplūdes materiālu un parauga ņemšanas stobriņu.

**Piezīme.** Caurplūdes materiāls satur Buffer RLT, tāpēc tas nav saderīgs ar balinātāju.

**Piezīme.** Pēc centrifugēšanas uzmanīgi izņemiet RNeasy MinElute rotācijas kolonnu no parauga ņemšanas stobriņa tā, lai kolonna nesaskartos ar caurplūdi. Pretējā gadījumā notiks etanola pārvešana.

7. Ievietojiet RNeasy MinElute Spin Column jaunā 2 ml parauga ņemšanas stobriņā (iekļauts komplektācijā).
8. Atveriet rotācijas kolonnas vāciņu un 5 minūtes centrifugējiet ar pilnu ātrumu. Izmetiet caurplūdes materiālu un parauga ņemšanas stobriņu.

Lai izvairītos no rotācijas kolonnu vāciņu bojāšanas, ievietojiet rotācijas kolonnas centrifūgā ar vismaz vienu tukšu pozīciju starp kolonnām. Pavērsiet vāciņus tā, ka tie būtu vērsti rotora rotācijai pretējā virzienā (piem., ja rotors griežas pulksteņrādītāju virzienā, pavērsiet vāciņus pretēji pulksteņrādītāju virzienam).

Ir svarīgi nožāvēt rotācijas kolonnas membrānu, jo atlikušais etanols var traucēt pakārtotās reakcijas. Centrifugējot rotācijas kolonnas ar atvērtiem vāciņiem, tiek nodrošināts, ka RNS eluēšanas laikā netiek pārnesti etanols.

9. Ievietojiet RNeasy MinElute Spin Column jaunā 1,5 ml parauga ņemšanas stobriņā (iekļauts komplektācijā).

10. Pievienojiet 20 µl ūdens bez RNase tieši rotācijas kolonnas membrānas centrā.  
Saudzīgi aizveriet vāciņu un 1 minūti centrifugējiet ar pilnu ātrumu, lai eluētu RNS.
11. Kad eluēšana darbība ir pabeigta, novietojiet paraugus uz ledus.
12. Izmēriet apstrādājamo paraugu tilpumu un pielāgojiet tā, lai galīgā koncentrācija būtu 200 ng/µl.  
Ja nepieciešams, plašāku informāciju skatiet "RNS kvalitatīvā un kvantitatīvā noteikšana", 25

## Atgriezeniskā transkripcija

### Pirms darba sākšanas veicamās darbības

- Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus, izņemot apgriezto transkriptāzi, kura neizmantošanas laikā ir jāglabā saldētavā. Stobriņus, kuros ir atkausējamie komponenti, novietojiet uz ledus.  
**Piezīme.** Atkausēšanas posmā nepārsniedziet 30 minūtes, lai nepieļautu materiālu noārdīšanos.
- Notīriet galda zonu, kas paredzēta atgriezeniskās transkripcijas (RT) maisījuma sagatavošanai, lai nodrošinātu, ka nav matricas vai nukleāzes piesārņojuma.
- Labi samaisiet, 10 reizes pipetējot uz augšu un uz leju stobriņos, kuros ir atgriezeniskās transkripcijas reaģenti, RNS paraugi, pozitīvās kontroles un IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators), un pirms lietošanas īsi centrifugējiet. Pēc tam glabājiet uz ledus.
- RT negatīvā kontrole tiek ģenerēta atgriezeniskās transkripcijas posmā, izmantojot PCR kategorijas ūdeni bez nukleāzes.
- Vajadzīgā ievade ir 3 µg RNS uz paraugu.
- *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ietilpst pietiekami daudz reaģentu, lai trīs reizes apstrādātu astoņus paraugus.

## Procedūra

1. Inkubējiet 15 µl no katra parauga, pozitīvās kontroles (augstas un zemas pozitīvās kontroles), ūdeni (izmantots RT negatīvās kontroles ģenerēšanai) un IS-MMR kalibratoru 5 minūtes 65 °C temperatūrā. Pēc tam nekavējoties atdzesējiet uz ledus vismaz 5 minūtes.
2. Īsu brīdi centrifugējiet (aptuveni 5 sekundes), lai šķidrums nokristu stobriņa apakšdaļā. Pēc tam glabājiet uz ledus.
3. Sagatavojiet tālāk aprakstīto RT maisījumu atbilstoši apstrādājamo paraugu, kontroļu un kalibratoru skaitam (**1. tabula**).

**Piezīme:** galīgajam tilpumam vienā reakcijā jābūt 25 µl.

### 1. RT maisījuma sagatavošana

Komponents	Katra parauga tilpums (µl)	RT maisījums: 12 +1 reakcijas (µl)	Galīgā koncentrācija
RT Mix, 3.33x	7,5	97,5	1x
Apgrieztā transkriptāze, 10x	2,5	32,5	1x
Galīgais RT maisījuma tilpums (jāpievieno 4. darbībā)	10	130	–
Paraugi, pozitīvās kontroles, IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators) vai ūdens (no 1. darbības)	15	15 katram	–
<b>Kopējais tilpums</b>	<b>25</b>	<b>25 katram</b>	<b>–</b>

4. Pipetējiet 10 µl RT maisījuma katrā marķētajā stobriņā, kas satur RNS paraugu, pozitīvās kontroles, ūdeni vai kalibratoru (no 3. darbības).
5. Labi samaisiet, 10 reizes pipetējot uz augšu un uz leju, un īsi centrifugējiet (aptuveni 5 sekundes), lai šķidrums nokristu stobriņa apakšā.

**Piezīme.** Pēc reakciju izveidošanas, lai izvairītos no jebkādas materiālu noārdīšanās, nolieciet visus atgriezeniskās transkripcijas reaģentus *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit atpakal saldētavā.

6. Ievietojiet stobriņus termiskajā ciklerī un startējiet atgriezeniskās transkripcijas programmu (2. tabula).

**2. Atgriezeniskās transkripcijas temperatūras profils**

<b>Darbība</b>	<b>Parametri</b>
Atgriezeniskā transkripcija 1	Temperatūra: 25 °C Laiks: 10 minūtes
Atgriezeniskā transkripcija 2	Temperatūra: 46 °C Laiks: 45 minūtes
Inaktivēšana	Temperatūra: 85 °C Laiks: 5 minūtes
Dzesēšana	Temperatūra: 4 °C Laiks: 5 minūtes

7. Kad programma ir pabeigta, īsu brīdi centrifugējiet stobriņus (aptuveni 5 sekundes), lai šķidrums nokristu stobriņa apakšā. Turiet stobriņus uz ledus vai –20 °C temperatūrā līdz qPCR eksperimenta veikšanai.

## Manuālā analīze: qPCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrumentā ar 72 stobriņu rotoru un RGQ programmatūru

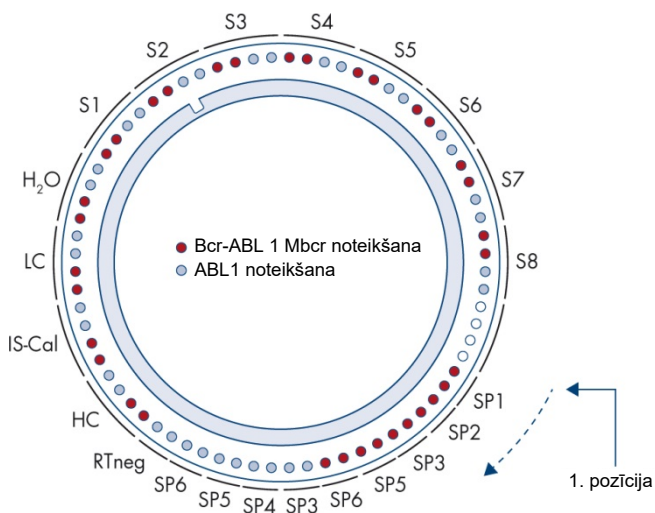
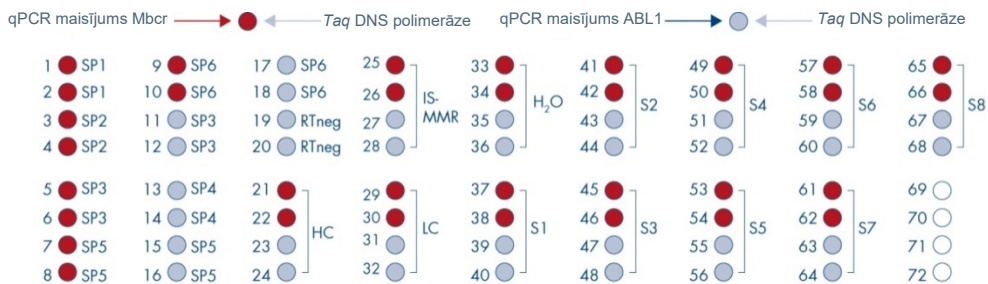
Mēs iesakām visus mērījumus veikt divos eksemplāros, kā norādīts **3. tabulā**. Šis komplekts ir paredzēts astoņu cDNS paraugu testēšanai vienā eksperimentā divas reizes. Ar *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit var veikt trīs eksperimentus.

### 3. Reakciju skaits Rotor-Gene Q instrumentiem ar 72 stobriņu rotoru

Paraugs	Reakcijas
<b>Ar qPCR Mix ABL1 (34 reakcijas)</b>	
8 cDNS paraugi	8 x 2 reakcijas
1 cDNA High Positive Control (Augsti pozitīva kontrole)	2 reakcijas
1 cDNA Low Positive Control (Zemi pozitīva kontrole)	2 reakcijas
1 cDNS IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators)	2 reakcijas
Vienas plazmīdas standarti	4 x 2 reakcijas (SP3, SP4, SP5 un SP6)
RT negatīvā kontrole	2 reakcijas
Ūdens kontrole	2 reakcijas
<b>Ar qPCR Mix MbcR (34 reakcijas)</b>	
8 cDNS paraugi	8 x 2 reakcijas
1 cDNA High Positive Control (Augsti pozitīva kontrole)	2 reakcijas
1 cDNA Low Positive Control (Zemi pozitīva kontrole)	2 reakcijas
1 cDNS IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators)	2 reakcijas
Vienas plazmīdas standarti	5 x 2 reakcijas (SP1, SP2, SP3, SP5 un SP6)
Ūdens kontrole	2 reakcijas

## levietošanas bloka un rotora iestatīšana

Mēs iesakām viena eksperimenta laikā testēt vismaz astoņus cDNS paraugus, lai optimizētu standartu un praimeru un zondes maisījumu lietojumu. Rotoru shēmā 3. attēlā ir parādīts eksperimenta piemērs.



**3. Rotora iestatījums katram eksperimentam. SP1–SP6:** BCR-ABL1 Mbcr un ABL1 standarti; **RTneg:** RT negatīva kontrole; **IS-Cal:** IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators); **HC:** High Positive Control (Augsti pozitīva kontrole); **LC:** Low Positive Control (Zemi pozitīva kontrole); **H<sub>2</sub>O:** ūdens kontrole; **S1–S8:** cDNS paraugi.



**Piezīme.** Visas tukšās pozīcijas aizpildiet ar tukšiem stobriņiem. Cipari norāda pozīcijas ievietošanas blokā un rotora galīgo pozīciju.

## qPCR iestatīšana

### Pirms darba sākšanas veicamās darbības

- Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus, izņemot *Taq* DNS polimerāzi, kura neizmantošanas laikā ir jāglabā saldētavā. Stobriņus, kuros ir atkausējamie komponenti, novietojiet uz ledus.

**Piezīme.** Atkausēšanas posmā nepārsniedziet 30 minūtes, lai nepieļautu materiālu noārdīšanos.

- Notīriet galda zonu, kas atvēlēts PCR maisījuma sagatavošanai, lai nodrošinātu, ka nenotiek matricas vai nukleāzes kontaminācija.
- Labi samaisiet stobriņus, kuros ir qPCR Mix ABL1 un qPCR Mix Mbcr, 10 reizes pipetējot uz augšu un uz leju, un pirms lietošanas īsi centrifugējiet. Pēc tam glabājiet uz ledus.

### Procedūra

1. Sagatavojiet PCR pamatmaisījumu atkarībā no apstrādājamo paraugu skaita.  
4. tabulā aprakstīta pipetēšanas shēma reaģenta maisījuma sagatavošanai, kas aprēķināta, lai iegūtu galīgo reakcijas tilpumu 25 µl. Maisījumu var sagatavot iepriekš atkarībā no reakciju skaita, izmantojot tos pašus praimerus un zondes maisījumu (qPCR Mix ABL1 vai qPCR Mix Mbcr). Lai kompensētu pipetēšanas kļūdu, ir iekļauti papildu tilpumi.

**Piezīme.** Neizmantojiet reakcijas tilpumus (reakcijas maisījums plus paraugs), kas mazāki par 25 µl.

#### 4. PCR pamatmaisījuma sagatavošana

Komponents	1 reakcija (µl)	Iepriekš sagatavots maisījums ABL1 vai Mbcr: 34 +2 reakcijas (µl)	Gaīgā koncentrācija
qPCR Mix (qPCR Mix ABL1 vai qPCR Mix Mbcr)	19,75	711	1x
Taq DNS polimerāze	0,25	9	1x
Paraugs, standarts, kontrolē vai IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators) (pievienošanai 3. darbībā)	5	5 katram	–
<b>Kopējais tilpums</b>	<b>25</b>	<b>25 katram</b>	<b>–</b>

2. Iepildiet 20 µl iepriekš sagatavotā qPCR maisījuma katrā 0,1 ml Rotor-Gene Q stobriņā.
3. Pievienojiet 5 µl RT produkta (cDNS), kas iegūts pēc atgriezeniskā transkripcijas darbības (skatiet "Atgriezeniskā transkripcija", 28), 5 µl standartu, 5 µl kontroļu vai IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators) saskaņā ar parauga izkārtojumu, kā parādīts 4. attēlā (kopējais tilpums: 25 µl).
4. Uzmanīgi samaisiet, pipetējot uz augšu un uz leju.

#### Rotor-Gene MDx sagatavošana un qPCR izpildes sākšana

1. Ievietojiet stobriņus kopā ar instrumentu piegādātajā adapterī.  
**Piezīme.** Neizmantojās pozīcijas ir jāaizpilda ar tukšiem stobriņiem.
2. Novietojiet slēdzējgredzenu virs stobriņiem un nospiediet, lai nobloķētu.
3. Pilno adapteri ievietojiet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrumentā.
4. Ieprogramējiet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrumentam termālā cikla programmu, kā norādīts 5. tabulā.  
**Piezīme.** Nolieciet visus *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit komponentus atpakaļ saldētavā, lai nepieļautu materiāla noārdīšanos.

## 5. qPCR temperatūras profils

Darbība	Parametri
Analīzes režīms	Kvantitatīvā noteikšana
Hold 1 (1. glabāšana)	Temperatūra: 95 °C Laiks: 15 minūtes
Ciklošana	50 cikli 94 °C; 15 sekundes 60 °C; 60 sekundes, iegūstot FAM fluorescenci Green kanālā:

5. Dialoglodziņā "New Run Wizard" (Jaunas izpildes vednis) noklikšķiniet uz "Gain Optimisation" (Pastiprinājuma optimizēšana), lai atvērtu dialoglodziņu "Auto-Gain Optimisation Setup" (Automātiskā pastiprinājuma optimizēšanas iestatīšana). Pārbaudiet kanāla Green diapazonu no "5 FI" vienumam "Min Reading" (Min. rādījums) līdz "10 FI" vienumam "Max Reading" (Maks. rādījums), un pieņemamo Gain (Pastiprinājuma) diapazonu no –10 līdz 10.
6. Pārbaudiet, vai ir atzīmēta izvēles rūtiņa "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Veikt optimizēšanu pirms 1. iegūšanas) un aizveriet dialoglodziņu "Auto-Gain Optimisation Setup" (Automātiskā pastiprinājuma optimizēšanas iestatīšana).
7. Startējiet termiskās ciklošanas programmu.
8. Izveidojiet gan ABL1, gan MbcR apakškopas, aizpildot logu "Edit samples" (Rediģēt paraugus).
9. Kad termiskais cikls ir pabeigts, izvēlieties "Options" (Iespējas) un "Crop Start Cycles" (Apgriezt sākuma ciklus). Noņemiet datus pirms cikla 10. Pēc tam atlasiet "Analysis" (Analīze) un "Cycling A. Green from 10" (Cikls A. Green no 10), kas pārskatā norādīts kā "kreisā robežvērtība = 10,00".

10. ABL1 un Mbcr rīkojieties šādi:

- ja tiek atvērts logs "Calculate Automatic Threshold" (Aprēķināt automātisko robežvērtību), atlasiet "Cancel" (Atcelt).
- Definējiet robežvērtību kā 0,03 (loga labajā pusē, apakšā).
- Atlasiet "Dynamic Tube" (Dinamiskais stobriņš) kā normalizēšanas metodi pārskatā un "Slope Correct" (Slīpuma koriģēšana), lai koriģētu trokšņa slīpumu.
- Pārbaudiet, vai "Outlier Removal" (Traucējošās vielas noņemšana) ir iestatīta uz vērtību 0 % (atbilstīgi NTC robežvērtībai) un ir atspējota "Reaction Efficiency Threshold" (Reakcijas efektivitātes robežvērtība).
- Iestatiet diagrammu kā lineāru skalu un "Auto-Scale" (Automātiskā skala).
- Ar peles labo pogu noklikšķiniet uz loga, kurā redzamas amplifikācijas līknes, un pārbaudiet, vai "Digital filter" (Digitālais filtrs) ir iestatīts uz "Light" (Gaisma).
- Atlasiet opciju "named on" (rādīt ar nosaukumu) (loga labajā pusē), lai pārliecinātos, ka tiek parādīti visi paraugi.

Kad visas darbības ir pabeigtas, nodrošiniet neapstrādātu datu ierakstīšanu un pārejiet pie rezultātu analīzes (skatiet "Datu analīzes princips", 48)

## Automatizētā analīze: qPCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrumentā ar 72 stobriņu rotoru un RGAM programmatūru

Mēs iesakām visus mērījumus veikt divos eksemplāros, kā norādīts 6. tabulā. Šis komplekts ir paredzēts astoņu cDNS paraugu testēšanai vienā eksperimentā divas reizes. Ar *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit var veikt trīs eksperimentus.

### 6. Reakciju skaits Rotor-Gene Q instrumentiem ar 72 stobriņu rotoru

Paraugs	Reakcijas
<b>Ar qPCR Mix ABL1 (34 reakcijas)</b>	
8 cDNS paraugi	8 x 2 reakcijas
1 cDNA High Positive Control (Augsti pozitīva kontrole)	2 reakcijas
1 cDNA Low Positive Control (Zemi pozitīva kontrole)	2 reakcijas
1 cDNS IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators)	2 reakcijas
Vienas plazmīdas standarti	4 x 2 reakcijas (SP3, SP4, SP5 un SP6)
RT negatīvā kontrole	2 reakcijas
Ūdens kontrole	2 reakcijas
<b>Ar qPCR Mix MbcR (34 reakcijas)</b>	
8 cDNS paraugi	8 x 2 reakcijas
1 cDNA High Positive Control (Augsti pozitīva kontrole)	2 reakcijas
1 cDNA Low Positive Control (Zemi pozitīva kontrole)	2 reakcijas
1 cDNS IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators)	2 reakcijas
Vienas plazmīdas standarti	5 x 2 reakcijas (SP1, SP2, SP3, SP5 un SP6)
Ūdens kontrole	2 reakcijas

## Svarīgas piezīmes pirms darba sākšanas

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit komplekts Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrumentā ir jāizpilda, izmantojot Rotor-Gene AssayManager v2.1. Pirms sākat protokola izpildi, rūpīgi iepazīstieties ar Rotor-Gene Q MDx instrumentu. Detalizētu informāciju skatiet lietotāja rokasgrāmatās, kas paredzētas šim instrumentam, Rotor-Gene AssayManager programmatūras versijai 2.1 un Gamma Plug-in (Gamma spraudnim).

Rotor-Gene AssayManager v2.1 sniedz iespēju automatizēti interpretēt PCR rezultātus. Ciklošanas parametri izpildei ir bloķēti.

## Pirms darba sākšanas veicamās darbības

Datorā, kas savienots ar Rotor-Gene Q, ir jābūt instalētai Rotor-Gene AssayManager programmatūras versijai 2.1, un to var lejupielādēt QIAGEN tīmekļa vietnē: [http://www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager\\_v2.1.aspx](http://www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2.1.aspx). Detalizētu informāciju par Rotor-Gene AssayManager v2.1 pamatprogrammatūras instalēšanu, lūdzu, skatiet *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application lietotāja rokasgrāmatā*.

- *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit nepieciešams speciāls Gamma Plug-in (Gamma spraudnis). Šo spraudni var lejupielādēt QIAGEN tīmekļa vietnē: <https://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=bfb8c9a8-245b-4ab4-99ea-1b39e2c243a0&lang=en>. Šis spraudnis ir jāinstalē datorā, kurā jau ir instalēta Rotor-Gene AssayManager versija 2.1.
- *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ir nepieciešams arī analīzes profils. Šajā analīzes profilā (\*.iap fails) ir visi parametri, kas nepieciešami qPCR analīzes ciklošanai un analizēšanai. To var lejupielādēt *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit veltītajā tīmekļa lapā QIAGEN tīmekļa vietnē <https://www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-BCR-ABL1-mbcR-gq-rt-pcr-kit-ce/#resources>. Analīzes profils ir jāimportē Rotor-Gene AssayManager v2.1 programmatūrā.

**Piezīme.** *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit var darboties tikai tad, ja Rotor-Gene AssayManager programmatūrā v2.1 ir ieprogrammēti noteikti konfigurācijas iestatījumi.

Visas sistēmas procesu drošības nolūkos slēgtajam režīmam ir jāiestata tālāk norādītie obligātie konfigurācijas iestatījumi.

- "Material number required" (Materiāla numurs obligāts)
- "Valid expiry date required" (Derīgs derīguma termiņš obligāts)
- "Lot number required" (Partijas numurs obligāts)

## Gamma spraudņa instalēšana un analīzes profila importēšana

Gamma Plug-in (Gamma spraudņa) instalēšana un analīzes profila importēšana ir aprakstīta Rotor-Gene AssayManager v2.1 un Gamma Plug-in (Gamma spraudnis) rokasgrāmatās, attiecīgi *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application lietotāja rokasgrāmata* un *Gamma Plug-in lietotāja rokasgrāmata*.

- Lejupielādējiet Gamma Plug-in (Gamma spraudni) un *ipsogen\_BCR-ABL1MbcR(ABL)\_blood\_CE* analīzes profila jaunāko versiju no QIAGEN tīmekļa vietnes.
- Startējiet instalēšanas procesu, veicot dubultklikšķi uz *RGAM\_V2\_1\_Gamma\_Plug-in.Installation.V1\_0\_0.msi* faila, un izpildiet instalēšanas instrukcijas. Detalizētu šī procesa aprakstu skatiet *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application lietotāja rokasgrāmata*, sadaļā "Spraudņu instalēšana".

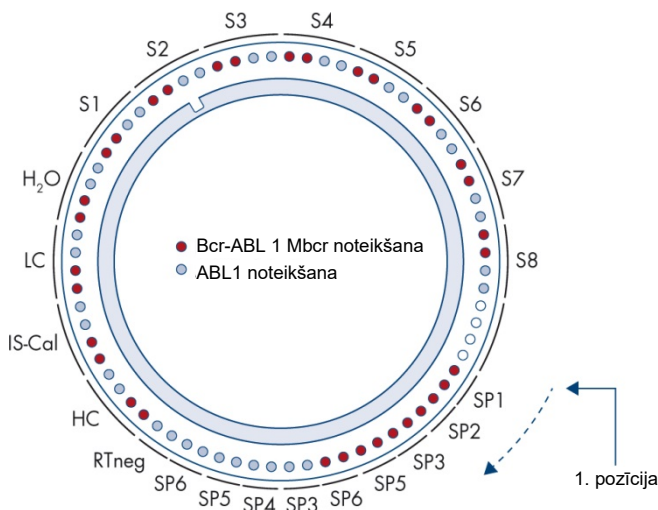
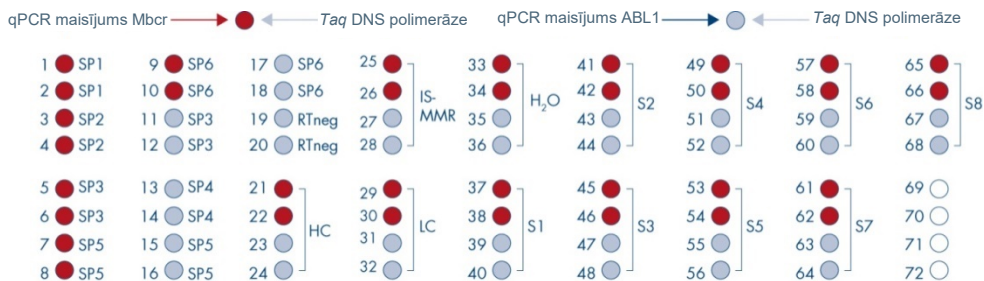
**Piezīme.** Visas sistēmas procesu drošības nolūkos atlasiet cilni "Settings" (Iestatījumi) un slēgtajam režīmam atzīmējiet izvēles rūtiņas vienumiem "Material number required" (Materiāla numurs obligāts), "Valid expiry date required" (Derīgs derīguma termiņš obligāts) un "Lot number required" (Partijas numurs obligāts) (sadaļa "Work list" (Darbu saraksts)). Ja tie nav iespējoti (atzīmēti), noklikšķiniet, lai iespējotu.

- 
- Kad spraudnis ir sekmīgi instalēts, personai ar administratora tiesībām attiecībā uz Rotor-Gene AssayManager programmatūru ir jāimportē ipsogen\_BCR-ABL1Mbc(ABL)\_blood\_CE analīzes profils tālāk aprakstītajā veidā.
1. Piesakieties Rotor-Gene AssayManager v2.1 programmatūrā kā lietotājs ar administratora tiesībām.
  2. Atlasiet konfigurācijas vidi.
  3. Atlasiet cilni "Assay Profiles" (Analīžu profili).
  4. Noklikšķiniet uz pogas "Import" (Importēt).
  5. Dialoglodziņā atlasiet ipsogen\_BCR-ABL1Mbc(ABL)\_blood\_CE analīzes profilu, ko vēlaties importēt, un pēc tam noklikšķiniet uz "Open" (Atvērt).
  6. Kad analīzes profils ir sekmīgi importēts, to var izmantot vidē "Setup" (Iestatīšana).
- Piezīme.** Vienu un to pašu analīzes profila versiju nevar importēt divreiz.



## Ievietošanas bloka un rotora iestatīšana

Mēs iesakām viena eksperimenta laikā testēt vismaz astoņus cDNS paraugus, lai optimizētu standartu un praimeru un zondes maisījumu lietojumu. Rotoru shēmā 4. attēlā ir parādīts eksperimenta piemērs.



**4. Rotora iestatījums katram eksperimentam. SP1–SP6:** BCR-ABL1 Mbcr un ABL1 standarti; **RTneg:** RT negatīva kontrole; **IS-Cal:** IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators); **HC:** High Positive Control (Augsti pozitīva kontrole); **LC:** Low Positive Control (Zemi pozitīvā kontrole); **H<sub>2</sub>O:** ūdens kontrole; **S1–S8:** cDNS paraugi. **Piezīme.** Visas tukšās pozīcijas aizpildiet ar tukšiem stobriņiem. Cipari norāda pozīcijas ievietošanas blokā un rotora galīgo pozīciju.



Stobriņi rotorā ir jāievieto, kā norādīts 4. attēlā, jo analīzes profilā iestatītā automatizētā analīze ir balstīta uz šo izkārtojumu. Ja tiek izmantots cits izkārtojums, iegūtajiem rezultātiem būs novirze.

**Piezīme.** Visas atlikušās pozīcijas aizpildiet ar tukšiem stobriņiem.

## Darbu saraksta izveidošana

Izveidojiet darbu sarakstu apstrādājamajiem paraugiem tālāk aprakstītajā veidā.

1. Ieslēdziet Rotor-Gene Q MDx instrumentu.
2. Atveriet Rotor-Gene AssayManager v2.1 programmatūru un piesakieties kā lietotājs ar operatora lomu slēgtajā režīmā.
3. Darbu saraksta pārvaldniekā noklikšķiniet uz pogas "New manual work list" (Jauns manuāls darbu saraksts) ("Setup" (Iestatīšana) vide).
4. Atlasiet "ipsogen\_BCR-ABL1Mbc(ABL)\_blood\_CE" analīzes profilu no pieejamo analīzes profilu saraksta darbībā "Assay" (Analīze).
5. Noklikšķiniet uz pogas "Add assay to work list" (Pievienot analīzi darbu sarakstam), lai atlasīto analīzes profilu pārsūtītu uz sarakstu "Selected assay profiles" (Atlasītie analīžu profili). Tagad šim analīzes profilam vajadzētu būt redzamam sarakstā "Selected assay profiles" (Atlasītie analīžu profili).
6. Atbilstošajā laukā ievadiet paraugu skaitu.
7. Atlasiet kopu "Kit information" (Komplekta informācija) un ievadiet tālāk norādīto *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit informāciju, kura ir uzdrukāta uz kārbas vāka.
  - Materiāla numurs: 0670923
  - Derīgs derīguma termiņš
  - Partijas numurs.

8. Atlasiet darbību "Samples" (Paraugi). Tiek parādīts saraksts ar paraugu detalizēto informāciju. Šis saraksts ataino gaidīto rotora izkārtojumu.
9. Ievadiet šajā sarakstā paraugu identifikācijas numuru(-us), kā arī visu paraugu papildinformāciju kā komentārus katram paraugam.
10. Atlasiet soli "Properties" (Rekvizīti) un ievadiet darbu saraksta nosaukumu.
11. Iespējojiet izvēles rūtiņu "is applicable" (attiecas).
12. Saglabājiet darbu sarakstu.
13. Darbu sarakstu var izdrukāt, un tas var noderēt qPCR sagatavošanai un iestatīšanai. Lai šo darbu sarakstu izdrukātu, nospiediet pogu "Print work list" (Drukāt darbu sarakstu). Kā daļa no šī darbu saraksta ir iekļauta arī detalizētā informācija par paraugiem.  
**Piezīme.** Darbu sarakstu var izveidot, kad instrumentā ir iestatīts eksperiments vai pirms instrumentā tiek pievienoti paraugi, kad var saglabāt darbu saraksta failu.

## qPCR iestatīšana

### Pirms darba sākšanas veicamās darbības

- Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus, izņemot *Taq* DNS polimerāzi, kura neizmantošanas laikā ir jāglabā saldētavā. Stobriņus, kuros ir atkausējamie komponenti, novietojiet uz ledus.  
**Piezīme.** Atkausēšanas posmā nepārsniedziet 30 minūtes, lai nepieļautu materiālu noārdīšanos.
- Notīriet galda zonu, kas atvēlēts PCR maisījuma sagatavošanai, lai nodrošinātu, ka nenotiek matricas vai nukleāzes kontaminācija.
- Labi samaisiet stobriņus, kuros ir qPCR Mix ABL1 un qPCR Mix Mbcr, 10 reizes pipetējot uz augšu un uz leju, un pirms lietošanas īsi centrifugējiet. Pēc tam glabājiet uz ledus.

## Procedūra

1. Sagatavojiet PCR pamatmaisījumu atkarībā no apstrādājamo paraugu skaita.

7. tabulā aprakstīta pipetēšanas shēma reaģenta maisījuma sagatavošanai, kas aprēķināta, lai iegūtu galīgo reakcijas tilpumu 25 µl. Maisījumu var sagatavot iepriekš atkarībā no reakciju skaita, izmantojot tos pašus praimerus un zondes maisījumu (qPCR Mix ABL1 vai qPCR Mix Mbcr). Lai kompensētu pipetēšanas kļūdu, ir iekļauti papildu tilpumi.

**Piezīme.** Neizmantojiet reakcijas tilpumus (reakcijas maisījums plus paraugs), kas mazāki par 25 µl.

### 7. PCR pamatmaisījuma sagatavošana

Komponents	1 reakcija (µl)	Iepriekš sagatavots maisījums ABL1 vai Mbcr: 34 +2 reakcijas (µl)	Galīgā koncentrācija
qPCR Mix (qPCR Mix ABL1 vai qPCR Mix Mbcr)	19,75	711	1x
Taq DNS polimerāze	0,25	9	1x
Paraugš, standarts, kontrolē vai IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators) (pievienošanai 3. darbībā)	5	5 katram	–
<b>Kopējais tilpums</b>	<b>25</b>	<b>25 katram</b>	<b>–</b>

2. Iepildiet 20 µl iepriekš sagatavotā qPCR maisījuma katrā 0,1 ml Rotor-Gene Q stobriņā.

3. Pievienojiet 5 µl RT produkta (cDNS), kas iegūts pēc atgriezeniskā transkripcijas darbības (skatiet "Atgriezeniskā transkripcija", 28), 5 µl standartu, 5 µl kontroļu vai IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators) saskaņā ar parauga izkārtojumu, kā parādīts 4. attēlā (kopējais tilpums: 25 µl).

4. Uzmanīgi samaisiet, pipetējot uz augšu un uz leju .

## Rotor-Gene MDx sagatavošana un qPCR izpildes sākšana

1. Novietojiet 72 iedobju rotoru uz Rotor-Gene Q MDx rotora turētāja.
2. Piepildiet rotoru ar teststrēmeļu stobriņiem atbilstoši piešķirtajām pozīcijām, sākot ar 1. pozīciju, kā parādīts 4. attēlā, visās neizmantotajās pozīcijās ievietojot tukšus, aizvākotus teststrēmeļu stobriņus.  
**Piezīme.** Pirmajam stobriņam ir jābūt ievietotam 1. pozīcijā, un teststrēmeļu stobriņiem ir jābūt ievietotiem pareizajā orientācijā un pozīcijās, kā parādīts 4. attēlā.
3. Pievienojiet slēdzējgredzenu.
4. Ievietojiet Rotor-Gene Q MDx instrumentā rotoru un slēdzējgredzenu un aizveriet instrumenta vāku.
5. Rotor-Gene AssayManager v2.1 programmatūrā vai nu atlasiet atbilstošo darbu sarakstu no darbu saraksta pārvaldnieka un noklikšķiniet uz pogas "Apply" (Lietot), vai, ja darbu saraksts joprojām ir atvērts, noklikšķiniet uz pogas "Apply" (Lietot).  
**Piezīme.** Ja eksperimentam atvēlētais darbu saraksts nav izveidots, pirms turpināt tālāk aprakstītajā veidā piesakieties Rotor-Gene AssayManager v2.1 un izpildiet darbību "Darbu saraksta izveidošana", 42.
6. Ievadiet eksperimenta nosaukumu.
7. Sadaļā "Cycler selection" (Ciklera atlase) atlasiet cikleri, ko paredzēts izmantot.
8. Pārbaudiet, vai slēdzējgredzens ir piestiprināts pareizi, un ekrānā apstipriniet, ka slēdzējgredzens ir piestiprināts.
9. Noklikšķiniet uz pogas "Start run" (Startēt izpildi). Jāsākas *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR izpildei.

## qPCR rezultātu izlaide un ziņošana

1. Kad izpilde ir pabeigta, noklikšķiniet uz "Finish run" (Pabeigt izpildi).
2. Atbrīvojiet un apstipriniet izpildi.
  - Lietotājiem, kas pierakstījušies ar lomu Approver (Apstiprinātājs): noklikšķiniet uz "Release and go to approval" (Atbrīvot un pāriet uz apstiprinājumu).
  - Lietotājiem, kas pierakstījušies ar lomu Operator (Operators): noklikšķiniet uz "Release" (Atbrīvot).
3. Ja noklikšķinājāt uz "Release and go to approval" (Atbrīvot un pāriet uz apstiprinājumu), tiek parādīti eksperimenta rezultāti.
4. Ja uz "Release" (Atbrīvot) noklikšķināja lietotājs, kuram ir lietotāja loma, ir jāpierakstās kādam ar lomu "Approver" (Apstiprinātājs) un jāatlasa vide "Approval" (Apstiprinājums).
  - a. Atfiltrējiet analīzes, ko nepieciešams apstiprināt, atlasot filtra opcijas un noklikšķinot uz pogas "Apply" (Lietot).
  - b. Atzīmējiet izvēles rūtiņu blakus "Experiment" (Eksperiments), kas jāapstiprina.
  - c. Noklikšķiniet uz pogas "Start approval" (Sākt apstiprināšanu).

Tā kā eksperimentā ir viens kalibrators, pirms paraugu galīgās apstiprināšanas cilnē "Calibrator" (Kalibrators) ir jāievada obligātā informācija par kalibratoru.

5. Atlasiet pogu "Use calibrator" (Lietot kalibratoru) un ievadiet atbilstošu vērtību (atrodama uz IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators) stobriņa vai Analīzes sertifikātā).

**Piezīme.** Šī vērtība ir jāievada divreiz laukos "Enter calibrator value" (Ievadīt kalibrators vērtību) un "Reenter calibrator value" (Atkārtoti ievadīt kalibrators vērtību).

Apstipriniet ievadītās vērtības, nospiežot pogu "Apply" (Lietot): rezultāti tiek atjaunināti.

**Piezīme.** Kad ir izlaists vismaz viens paraugs, kalibratoru vairs nevar mainīt.

6. Pārskatiet rezultātus un noklikšķiniet uz pogas "Release/Report data" (Atbrīvot/ziņot datus).

Noklikšķiniet uz "OK" (Labi). Atskaite tiek ģenerēta \*.pdf formātā un automātiski saglabāta iepriekš definētajā mapē.

---

Pēc noklusējuma šīs mapes ceļš ir: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Eksports) > Reports (Pārskati)**

**Piezīme.** Šo ceļu un mapi var mainīt vidē "Configuration" (Konfigurācija).

**Piezīme.** Problēmu novēršanai ir nepieciešama atbalsta pakotne no izpildes. Atbalsta pakotnes var ģenerēt no apstiprinājuma vai arhivēšanas vides (*Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application lietotāja rokasgrāmata*, 1.8. sadaļa "Problēmu novēršana", > "Atbalsta pakotnes izveide"). Papildus var noderēt auditācijas pieraksti no incidenta laika  $\pm 1$  diena. Šos auditācijas pierakstus var izgūt vidē Service (Apkalpošana) (*Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application lietotāja rokasgrāmata*, 1.5.5.5. sadaļa).

7. Iztukšojiet Rotor-Gene Q MDx instrumentu un utilizējiet teststrēmeļu stobriņus saskaņā ar vietējiem drošības noteikumiem.

---

# Rezultātu interpretācija RGQ Software (RGQ programmatūra)

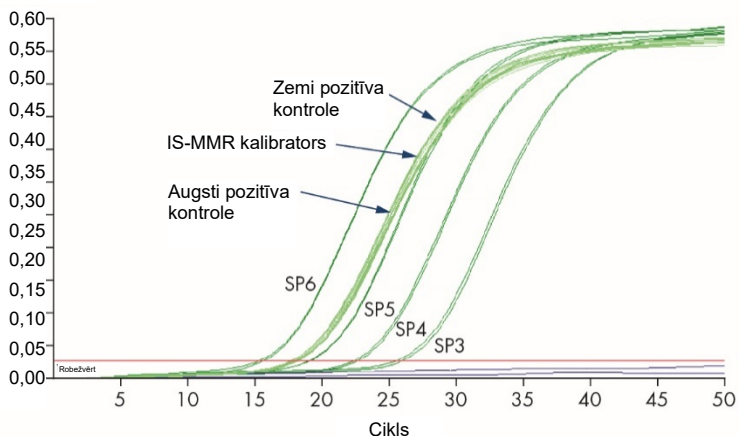
## Datu analīzes princips

Izmantojot TaqMan® tehnoloģiju, PCR ciklu skaitu, kas nepieciešams signāla noteikšanai virs robežvērtības, sauc par robežvērtības ciklu ( $C_T$ ), un tas ir tieši proporcionāls mērķa daudzumam reakcijas sākumā.

Izmantojot standartus ar zināmu molekulu skaitu, var izveidot standarta līkni un noteikt precīzu mērķa daudzumu testa paraugā. Standarta līknes ir atkarīgas no plazmīdas. Lai nodrošinātu, ka standarta līknes ir precīzas, tiek izmantoti četri standarta atšķaidījumi darbā ar ABL1 un pieci standarta atšķaidījumi darbā ar Mbcr. Komplektā ir arī IS kalibrators, sniedzot iespēju rezultātus konvertēt uz starptautisko mērogu. 5. attēlā un 6. attēlā ir redzami TaqMan amplifikācijas līkņu piemēri, līdzīgi tiem, kas standartiem, IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators) un High Positive RNA Control (Augsti pozitīva RNS kontrole) iegūti ar *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit.

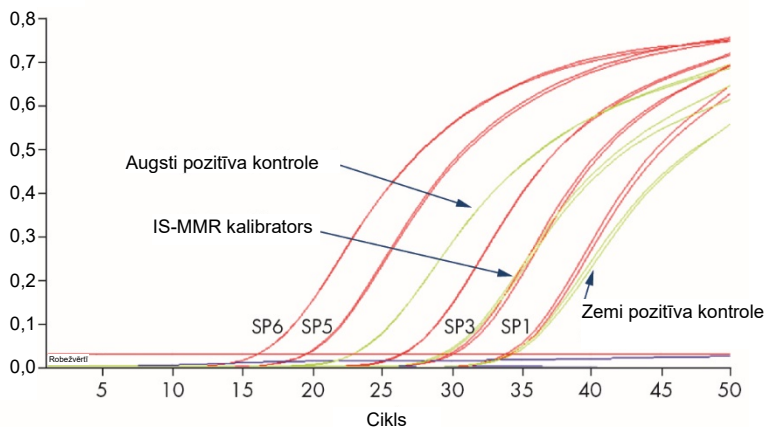


Norm. Fluor.



**5. ABL1 noteikšana ar kontrolēm un standartiem SP3, SP4, SP5 un SP6.**  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  un  $10^6$  kopijas/reakcija.

Norm. Fluor.



**6. BCR-ABL1 MbcR noteikšana ar kontrolēm un standartiem SP1, SP2, SP3, SP5 un SP6.**  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$  un  $10^6$  kopijas/reakcija.

## Uz neapstrādātiem datiem attiecināmās standartu līknes un kvalitātes kritēriji

### Reproducējamība starp atkārtojumiem

$C_T$  vērtību variācijai starp atkārtojumiem jābūt  $\leq 2$  vai dublikāts jāatzīst par nederīgu, izņemot tālāk norādītos gadījumus.

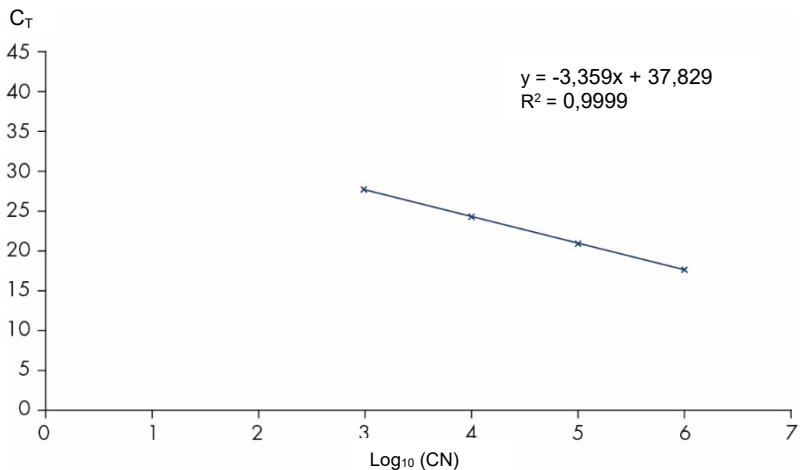
Ja vidējais  $C_T \geq 36$  vai ja  $C_{Ta} \geq 36$  un  $C_{Tb}$  ir "not detected" (nav noteikts), tad  $\Delta C_T$  kritēriji nav piemērojami; dublējums atbilst. Šādā gadījumā  $C_{Ta}$  aprēķinātais kopiju skaits (CN) jādala ar 2.

**Piezīme.** Lietotājiem ir jāizmēra reproducējamība savā laboratorijā.

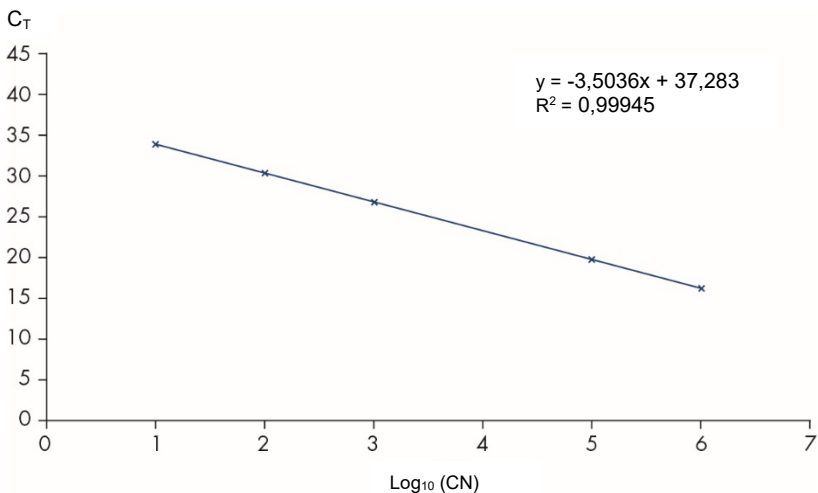
### Standartu līknes

Neapstrādātos datus var iekopēt Excel® failā analīzei.

Katram gēnam (ABL1 un BCR-ABL1 Mbc)  $C_T$  vērtības, kas iegūtas no plazmīdas standartu atšķaidījumiem, diagrammā tiek attēlotas atbilstoši log kopiju skaitam (3, 4, 5 un 6 for SP3, SP4, SP5 un SP6; 1, 2, 3, 5 un 6, paredz. SP1, SP2, SP3, SP5 un SP6). 7. attēla piemērā redzama ABL1 līkne, kas aprēķināta ar četriem standarta atšķaidījumiem. 8. attēla piemērā redzama BCR-ABL1 Mbc līkne, kas aprēķināta ar pieciem standarta atšķaidījumiem.



**7. ABL1 standarta līkne, aprēķināta no četriem standarta atšķaidījumiem.** Tiek aprēķināta lineāras regresijas līkne ( $y = ax + b$ ), kur "a" ir līnijas slīpums un "b" ir krustošanās ar y asi, t.i., y koordināte tam punktam, kurā līnija šķērso y asi. Vienādojums un noteikšanas koeficients ( $R^2$ ) tiek parādīts diagrammā.



**8. BCR-ABL1 Mbc standarta līkne, kas parēķināta no pieciem standarta atšķaidījumiem.** Tiek aprēķināta lineāras regresijas līkne ( $y = ax + b$ ), kur "a" ir līnijas slīpums un "b" ir krustošanās ar y asi, t.i., y koordināte tam punktam, kurā līnija šķērso y asi. Vienādojums un noteikšanas koeficients ( $R^2$ ) tiek parādīts diagrammā.

Tā kā standarti ir desmitkārtīgi atšķaidījumi, līknes teorētiskais slīpums ir  $-3,3$ . Slīpums no  $-3,1$  līdz  $-3,6$  ir pieņemams, ja  $R^2$  ir  $> 0,95$ . Tomēr, lai iegūtu precīzus rezultātus, ieteicamā vērtība ir  $R^2 > 0,98$

**Piezīme.** Ir jānosaka SP1 standarta atšķaidījums (BCR-ABL1 plazmīda, 10 kopijas), lai izveidotu BCR-ABL Mbc<sub>r</sub> standartu līkni.

### Kopiju skaits (Copy number, CN)

ABL1 vai BCR-ABL1 Mbc<sub>r</sub> standarta līknes vienādojums jāizmanto, lai pārveidotu neapstrādātās C<sub>T</sub> vērtības (iegūtas ar qPCR Mix ABL1 vai qPCR Mix Mbc<sub>r</sub> nezināmiem paraugiem ABL1 vai BCR-ABL1 kopiju skaitam (ABL1<sub>CN</sub> vai BCR-ABL1 Mbc<sub>rCN</sub>).

$$\text{Log}_{10} \text{ paraugs ABL1CN} = \frac{\text{Vidējais ABL C}_T - \text{ABL1 standarta līknes krustpunkts}}{\text{ABL standarta līknes slīpums}}$$

$$\text{Log}_{10} \text{ paraugs BCR-ABL1 Mbc}_{rCN} = \frac{\text{Vidējā BCR-ABL1 Mbc}_r C_T - \text{BCR-ABL1 Mbc}_r \text{ standarta līknes krustpunkts}}{\text{BCR-ABL1 Mbc}_r \text{ standarta līknes krustpunkts}}$$

---

## Kvalitātes kontrole visām ABL1<sub>CN</sub> vērtībām

Slikta RNS kvalitāte vai problēmas RT-qPCR laikā var izraisīt zemu ABL1 kopiju skaitu.

Lai sasniegtu testa optimālo jutību, High Positive RNA Control (Augsti pozitīva RNS kontrole), Low Positive RNA Control (Zemi pozitīva RNS kontrole) un IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators) gadījumā ABL1<sub>CN</sub> jābūt vienādam vai lielākam par 100 000.

## RT negatīvās un ūdens kontroles

Kontrolēm bez matricas (No Template Control, NTC) PCR darbībai (ūdens kontrolei) un atgriezeniskās transkripcijas darbībai (RT negatīvā kontrole) vajadzētu uzrādīt nulles CN gan ABL1 gadījumā, gan BCR-ABL1 M<sub>bcr</sub> gadījumā. Līdz ar to C<sub>T</sub> nav jāiegūst vai C<sub>T</sub> vērtība ir augstāka par standarta līkņu krustpunktu. Ja šo NTC rezultāts ir pozitīvs, tas nozīmē, ka atgriezeniskās transkripcijas un/vai qPCR laikā ir notikusi krusteniskā kontaminācija.

## Normalizēts kopiju skaits (Normalized Copy Number, NCN)

Šo CN vērtību attiecība sniedz normalizēto kopiju skaitu (NCN):

$$\text{NCN} = \frac{\text{BCR-ABL1 Mbc}_{\text{rCN}}}{\text{ABL1}_{\text{CN}}} \times 100$$

Aprēķiniet NCN rezultātu High Positive RNA Control (Augsti pozitīva RNS kontrole) (NCN<sub>HC</sub>), Low Positive RNA Control (Zemi pozitīva RNS kontrole) (NCN<sub>LC</sub>), IS MMR kalibratoram (NCN<sub>cal</sub>) un katram paraugam (NCN<sub>paraugs</sub>).

### Normalizēta kopiju skaita vērtību kvalitātes kontrole

High Positive RNA Control (Augsti pozitīva RNS kontrole), Low Positive RNA Control (Zemi pozitīva RNS kontrole) un IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators) sniedz iespēju novērot ABL1 and BCR-ABL1 Mbc atgriezeniskās transkripcijas un amplificēšanas darbības transkripcijas kvantitatīvās noteikšanas laikā.

- NCN rezultātam, kas iegūts IS-MMR-Calibrator (IS-MMR kalibrators) un testēts ar *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit komplektu, jābūt 0,05–0,3 diapazonā, pretējā gadījumā NCN vērtības nevar konvertēt starptautiskajā mērogā.
- Eksperimenta jutīgumu var novērtēt tikai tad, ja tiek konstatēta Low Positive RNA Control (Zemi pozitīva RNS kontrole).

## Pārvēršana starptautiskā mērogā

**Piezīme.** Pirms interpretācijas apskatiet, kāda vērtība tiek uzrādīta IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibratora) stobriņa etiķetē vai komplekta komplektācijā iekļautajā analīzes sertifikātā. (Pārbaudiet, vai uz etiķetes un sertifikātā ir norādīta viena un tā pati vērtība).

Izmantojiet eksperimentālo IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators) NCN rezultātu ( $NCN_{cal}$ ) un tā piešķirto vērtību (IS-Cal vērtību), kas norādīta analīzes sertifikātā, lai aprēķinātu normalizēto kopiju skaitu starptautiskajā mērogā ( $IS-NCN_{paraugs}$ ).

$$IS-NCN_{paraugs} = \frac{NCN_{paraugs} \times IS-Cal \text{ vērtība}}{NCN_{cal}}$$

## IS-NCN vērtību kvalitātes kontrole

- IS- $NCN_{HC}$  rezultātam (NCN starptautiskajā mērogā šai High Positive RNA Control (Augsti pozitīva RNS kontrole)) nevajadzētu uzrādīt ievērojamu molekulāro reakciju ("No MMR" (Nav MMR), skatiet "Molekulārās reakcijas ziņošana" tālāk).
- IS- $NCN_{LC}$  rezultātam (NCN starptautiskajā mērogā šai Low Positive RNA Control (Zemi pozitīva RNS kontrole)) jābūt  $<0,01$  (MR4), lai nodrošinātu, ka pārlicinoši var noteikt MR4.5 statusu.

## Molekulārās reakcijas ziņošana

Nosakiet katra parauga molekulārās reakcijas statusu saskaņā ar skaidrojumu 8. tabulā.

### 8. Molekulārās reakcijas ziņošana

Gadījums	ABL CN	BCR-ABL1 Mbcn CN	IS-NCN%	Statuss
1	<10 000	<10	–	Sliktas kvalitātes paraugs
2	<10 000	≥10	>0,1	Nav MMR
		≥10	≤0,1	Nepārlicieņošs
		≥LOD	>0,1	Nav MMR
			≤0,1	MMR
3	10 000 ≤CN <sub>ABL</sub> <32 000	LOB<CN<LOD Aizstājiet CN ar LOD	>0,1	Nav MMR
			≤0,1	MMR
		≤LOB	–	Nav noteikts/MR4
		≥LOD	>0,1	Nav MMR
			0,01<IS≤0,1	MMR
			≤0,01	MR4
4	32 000 ≤CN <sub>ABL</sub> <100 000	LOB<CN<LOD Aizstājiet CN ar LOD	>0,1	Nav MMR
			0,01<IS≤0,1	MMR
			≤0,01	MR4
		≤LOB	–	Nav noteikts/MR4.5
		≥LOD	>0,1	Nav MMR
			0,01<IS ≤0,1	MMR
			0,0032<IS≤0,01	MR4
			≤0,0032	MR4.5
5	100 000 ≤CN <sub>ABL</sub>	LOB<CN<LOD Aizstājiet CN ar LOD	>0,1	Nav MMR
			0,01<IS≤0,1	MMR
			0,0032<IS≤0,01	MR4
			≤0,0032	MR4.5
		≤LOB	–	Nav noteikts/MR5

**LOB:** tukšo paraugu robeža; **LOD:** noteikšanas robeža; **MR:** molekulārā reakcija; **MMR:** ievērojama molekulārā reakcija.



## Kopsavilkums par kvalitātes kritērijiem

9. tabulā ir sniegts kopsavilkums par dažādiem kvalitātes kritērijiem un saistītajām vērtībām vai rezultātiem.

### 9. Kvalitātes kritēriju kopsavilkums

Kritēriji	Pieņemamās vērtības/rezultāti
$C_T$ vērtību variācijas starp atkārtojumiem	$\leq 2 C_T$ Izņemot, ja vidējais $C_T \geq 36$ vai ja $C_{Ta} \geq 36$ un $C_{Tb}$ ir "not detected" (nav noteikts): dubļējums atbilst. CN, kas aprēķināts $C_{Ta}$ , jādala ar 2.
Slīpums standarta līknēm	No $-3,1$ līdz $-3,6$
$R^2$ standarta līknēm	Vismaz $> 0,95$ (un labāk, ja $> 0,98$ )
SP1 standarta atšķaidījums (BCR-ABL1 10 kopiju plazmīda)	Jābūt noteiktam, lai izveidotu standarta līkni
Bioloģisko paraugu ABL <sub>CN</sub> vērtības kvalitātes kontrole	Skatiet 8. tabulu
High Positive RNA Control (Augsti pozitīva RNS kontrole), Low Positive RNA Control (Zemi pozitīva RNS kontrole), un IS-MMR-Calibrator (IS-MMR kalibrators)	$ABL1_{CN} \geq 100\ 000$
NTC (ūdens) un RTneg kontroles	Katram $ABL1_{CN} = 0$ un $Mbc_{r_{CN}} = 0$ (nav $C_T$ vērtības vai $C_T >$ standarta līknes krustpunkts)
NCN, kas iegūts IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators) ( $NCN_{cal}$ )	Jāiekļaujas diapazonā $0,05-0,3$
High Positive RNA Control (Augsti pozitīva RNS kontrole)	Ir jābūt noteiktai
Low Positive RNA Control (Zemi pozitīva RNS kontrole)	Ir jābūt noteiktai
IS-NCN <sub>HC</sub>	Statuss: nav ievērojamas molekulārās reakcijas
IS-NCN <sub>LC</sub>	IS-NCN <sub>LC</sub> $\leq 0,01$ (MR4) Jānosaka, lai nodrošinātu, ka pārliecinoši var noteikt MR4.5 statusu.

**C<sub>T</sub>**: robežvērtību cikls; **HC**: augsta kontrole; **IS**: Starptautisks standarts; **LC**: zema kontrole; **MR**: molekulārā reakcija; **MMR**: ievērojama molekulārā reakcija; **NCN**: normalizēts kopiju skaits; **NTC**: Kontrole bez matricas; **RTneg**: negatīva atgriezeniskā transkripcija.

# Rezultātu interpretācija RGAM programmatūrā

Šī analizēšana ir pilnīgi automatizēta.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 vispirms analizē amplifikācijas līknes un var atzīt par nederīgām neatbilstošās līknes atkarībā no to formas un trokšņa amplitūdas. Ja tā notiek, par nederīgu atzītajai līknei tiek piesaistīts karodziņš.

Testu paraugu rezultātus automātiski analizē un iestata Rotor-Gene AssayManager v2.1, bet šo rezultātu apstiprināšana un atbrīvošana ir jāveic lietotājam, kurš ir pieteicies ar apstiprinātāja lomu. Apstiprināšanai paredzētajiem paraugu rezultātiem atvēlētās rindas beigās ir trīs papildu apstiprinājuma pogas. Šīs pogas tiek izmantotas, lai paraugu rezultātus interaktīvi akceptētu vai noraidītu. Plašāku informāciju, lūdzu, skatiet *Gamma Plug-in lietotāja rokasgrāmatā*.

Pēc tam Rotor-Gene AssayManager v2.1 analizē izpildes kontroles:

- NTC (RT-neg un H<sub>2</sub>O) pārbauda, vai nav īpašas amplifikācijas (ABL1 and BCR-ABL1 Mbc).  
Mbc).
- ABL1 un BCR-ABL1 Mbc SP: šī validēšana ir balstīta uz katras kontroles R<sup>2</sup> un slīpnes vērtībām.
- HC: ABL1 kopiju skaitam jābūt pietiekami lielam, lai varētu interpretēt šo kontroli. Ja tā ir, tiks aprēķināts IS-NCN procentuālais daudzums. Šī izpildes kontrole tiek validēta, ja saskaņā ar testu tās statuss ir "No MMR" (Nav MMR).
- LC: ABL1 kopiju skaitam jābūt pietiekami lielam, lai varētu interpretēt šo kontroli. Ja tā ir, tiks aprēķināts IS-NCN procentuālais daudzums. Šī izpildes kontrole tiek validēta, ja saskaņā ar testu tās statuss ir MR4.

- IS-MMR Calibrator (IS-MMR kalibrators): ABL1 kopiju skaitam jābūt pietiekami lielam, lai varētu interpretēt šo kontroli. Ja tā ir, tiks aprēķināts NCN. Šī izpildes kontrole tiek validēta, ja tās NCN ir pieņemamā diapazonā saskaņā ar testu.

**Piezīme.** Izpildes beigās ģenerētajā pārskatā ir redzami no izpildes kontrolēm iegūtie rezultāti, un nederīgo datu priekšā ir nederīguma karodziņi.

Ja visas izpildē veiktās kontroles ir atbilstošas, Rotor-Gene AssayManager v2.1 analizē nezināmos paraugus.

Paraugā  $C_T$  vērtību variācijai starp atkārtojumiem jābūt pietiekami zemai, lai rezultātus varētu interpretēt. Pēc tam tiek aprēķināts IS-NCN procentuālais daudzums un sniegts parauga statuss.

**Piezīme.** Ja gan izpildes kontroles, gan paraugu rezultāti ir derīgi, pārskatā tiks parādīts ABL1 un BCR-ABL1 MbcR kopiju skaits, NCN (%), IS-NCN (%) un katra parauga molekulārās reakcijas statuss.

10. tabulā un 11. tabulā ir redzami par nederīgu atzīta parauga brīdinājuma karodziņi, kas Rotor-Gene AssayManager v2.1 analizēšanas laikā var tikt piesaistīti atsevišķam stobriņam kopā ar skaidrojumu par karodziņa nozīmi.

## 10. Par nederīgu atzīta parauga karodziņi un jēdzienu skaidrojums

Karodziņš	Apraksts
ANALYSIS_FAILED	Anālizē ir iestatīta kā nederīga, jo analizēšana neizdevās. Sazinieties ar QIAGEN tehniskā atbalsta dienestu.
ASSAY_INVALID	Anālizē ir nederīga, jo vismaz viena ārējā kontrole neizdevās.
CONSECUTIVE_FAULT	Mērķis, kurš tika izmantots šī mērķa aprēķināšanai, ir nederīgs.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Neapstrādāto datu amplifikācijas līknes forma atšķiras no šai analīzei noteiktās uzvedības. Pastāv liela varbūtība, ka rezultāti ir nepareizi vai tiek interpretēti nepareizi.
FLAT_BUMP	Neapstrādāto datu amplifikācijas līknes forma ir plakans izcilnis, kas atšķiras no šai analīzei noteiktās uzvedības. Pastāv liela varbūtība, ka rezultāti ir nepareizi vai tiek interpretēti nepareizi (piem., nepareiza C <sub>T</sub> vērtības noteikšana).
HIGH_PC_HIGH_DELTA_CT (ABL or Mbcr)	C <sub>T</sub> vērtību variācija starp High Positive Control (Augsti pozitīva kontrole) atkārtojumiem kontroles gēnu maisījumā ir pārāk liela.
HIGH_PC_HIGH_DELTA_CT (Mbcr)	C <sub>T</sub> vērtību variācija starp High Positive Control (Augsti pozitīva kontrole) atkārtojumiem apvienoto gēnu maisījumā ir pārāk liela.
HIGH_PC_LOW_ABL_CN	Kontroles gēna kopiju skaits, kas paredzēts High Positive Control (Augsti pozitīva kontrole), ir pārāk zems.
HIGH_PC_LOW_IS-NCN	Normalizēts kopiju skaits (Starptautiskais mērogs), kas paredzēts High Positive Control (Augsti pozitīva kontrole), ir pārāk zems.
HIGH_PC_NO_CT (ABL)	Nav nosakāma C <sub>T</sub> High Positive Control (Augsti pozitīva kontrole) kontroles gēnu maisījumā.
HIGH_PC_NO_CT (Mbcr)	Nav nosakāma C <sub>T</sub> High Positive Control (Augsti pozitīva kontrole) apvienoto gēnu maisījumā.
HIGH_PC_REPLICATE_NO_CT (ABL)	Viens no High Positive Control (Augsti pozitīva kontrole) atkārtojumiem kontroles gēnu maisījumā nav noteikts.
HIGH_PC_REPLICATE_NO_CT (Mbcr)	Viens no High Positive Control (Augsti pozitīva kontrole) atkārtojumiem apvienoto gēnu maisījumā nav noteikts.
INVALID_CALCULATION	Aprēķins šim mērķim neizdevās.
IS-CAL_HIGH_DELTA_CT (ABL)	C <sub>T</sub> vērtību variācija starp IS-MMR-Calibrator Positive Control (IS-MMR kalibratora pozitīva kontrole) atkārtojumiem kontroles gēnu maisījumā ir pārāk liela.

<b>Karodziņš</b>	<b>Apraksts</b>
IS-CAL_HIGH_DELTA_CT (Mbc <sub>r</sub> )	C <sub>T</sub> vērtību variācija starp IS-MMR-Calibrator (IS-MMR kalibratora) atkārtojumiem apvienoto gēnu maisījumā ir pārāk liela.
IS-CAL_HIGH_NCN	Normalizēts kopiju skaits, kas paredzēts IS-MMR-Calibrator (IS-MMR kalibrators), ir pārāk augsts.
IS-CAL_LOW_ABL_CN	Kontroles gēna kopiju skaits, kas paredzēts IS-MMR-Calibrator (IS-MMR kalibrators), ir pārāk zems.
IS-CAL_LOW_NCN	Normalizēts kopiju skaits, kas paredzēts IS-MMR-Calibrator (IS-MMR kalibrators), ir pārāk zems.
IS-CAL_REPLICATE_NO_CT (ABL)	Viens no IS-MMR-Calibrator (IS-MMR kalibrators) atkārtojumiem kontroles gēnu maisījumā nav noteikts.
IS-CAL_REPLICATE_NO_CT (Mbc <sub>r</sub> )	Viens no IS-MMR-Calibrator (IS-MMR kalibrators) atkārtojumiem apvienoto gēnu maisījumā nav noteikts.
LOW_PC_HIGH_DELTA_CT (ABL)	C <sub>T</sub> vērtību variācija starp Low Positive Control (Zemi pozitīva kontrole) atkārtojumiem kontroles gēnu maisījumā ir pārāk liela.
LOW_PC_HIGH_DELTA_CT (Mbc <sub>r</sub> )	C <sub>T</sub> vērtību variācija starp Low Positive Control (Zemi pozitīva kontrole) atkārtojumiem apvienoto gēnu maisījumā ir pārāk liela.
LOW_PC_HIGH_IS-NCN	Normalizēts kopiju skaits (Starptautiskais mērogs), kas paredzēts Low Positive Control (Zemi pozitīva kontrole), ir pārāk liels.
LOW_PC_LOW_ABL_CN	Kontroles gēna kopiju skaits, kas paredzēts Low Positive Control (Zemi pozitīva kontrole), ir pārāk mazs.
LOW_PC_NO_CT (ABL)	Nav nosakāms C <sub>T</sub> Low Positive Control (Zemi pozitīva kontrole) kontroles gēnu maisījumā.
LOW_PC_NO_CT (Mbc <sub>r</sub> )	Nav nosakāms C <sub>T</sub> Low Positive Control (Zemi pozitīva kontrole) apvienoto gēnu maisījumā.
LOW_PC_REPLICATE_NO_CT (ABL)	Viens no Low Positive Control (Zemi pozitīva kontrole) atkārtojumiem kontroles gēnu maisījumā nav noteikts.
LOW_PC_REPLICATE_NO_CT (Mbc <sub>r</sub> )	Viens no Low Positive Control (Zemi pozitīva kontrole) atkārtojumiem apvienoto gēnu maisījumā nav noteikts.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Amplifikācijas līkne šķērso sliekšni vairākas reizes. Nepārprotamu C <sub>T</sub> nevar noteikt.
NO_BASELINE	Sākotnējā bāzlīnija nav atrasta. Turpmāko analizēšanu nevar veikt.
NTC_UNEXPECTED_VALUE	C <sub>T</sub> ir konstatēts kontrolē bez matricas.
OTHER_TARGET_INVALID	Vēl viens mērķis tam pašam paraugam ir nederīgs.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE	Aprēķinātā koncentrācija šim paraugam pārsniedz tehnisko robežu.

<b>Karodziņš</b>	<b>Apraksts</b>
RUN_FAILED	Anālie ir iestatīta kā nederīga, jo radās problēma ar ciklēr vai ciklera savienojumu.
RUN_STOPPED	Anālie ir iestatīta kā nederīga, jo izpilde tika apturēta manuāli.
SAMPLE_HIGH_DELTA_CT (ABL)	$C_T$ vērtību variācija starp testa parauga atkārtojumiem kontroles gēnu maisījumā ir pārāk liela.
SAMPLE_HIGH_DELTA_CT (Mbcrl)	$C_T$ vērtību variācija starp testa parauga atkārtojumiem apvienoto gēnu maisījumā ir pārāk liela.
SAMPLE_REPLICATE_NO_CT (ABL)	Viens no testa parauga atkārtojumiem kontroles gēnu maisījumā nav noteikts.
SAMPLE_REPLICATE_NO_CT (Mbcrl)	Viens no testa parauga atkārtojumiem apvienoto gēnu maisījumā nav noteikts.
SATURATION	Jēlratu fluorescenci ir stiprs piesātinājums pirms amplifikācijas līknes pārliekuma punkta.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Amplifikācijas līknē ir konstatēts piķis $C_T$ vērtības tuvumā.
SP_HIGH_SLOPE (ABL)	Tiek pārsniegta kontroles gēna līknes augšējā robeža.
SP_HIGH_SLOPE (Mbcrl)	Tiek pārsniegta apvienotā gēna līknes augšējā robeža.
SP_LOW_RSQUARED (ABL)	Netiek ievērota kontroles gēna $R^2$ apakšējā robeža.
SP_LOW_RSQUARED (Mbcrl)	Netiek ievērota apvienotā gēna $R^2$ apakšējā robeža.
SP_LOW_SLOPE (ABL)	Netiek ievērota kontroles gēna līknes apakšējā robeža.
SP_LOW_SLOPE (Mbcrl)	Netiek ievērota apvienotā gēna līknes apakšējā robeža.
SP1_NO_CT (Mbcrl)	Nav nosakāma $C_T$ standarta plazmīdai 1 apvienoto gēnu maisījumā.
STANDARD_HIGH_DELTA_CT (ABL)	$C_T$ vērtību variācija starp standarta atkārtojumiem kontroles gēnu maisījumā ir pārāk liela.
STANDARD_HIGH_DELTA_CT (Mbcrl)	$C_T$ vērtību variācija starp standarta atkārtojumiem apvienoto gēnu maisījumā ir pārāk liela.
STANDARD_REPLICATE_NO_CT (ABL)	Viens no standarta atkārtojumiem kontroles gēnu maisījumā nav noteikts.
STANDARD_REPLICATE_NO_CT (Mbcrl)	Viens no standarta atkārtojumiem apvienoto gēnu maisījumā nav noteikts.
STEEP_BASELINE	Amplifikācijas līknē jēlratu fluorescenci ir konstatēts straujš bāzlinijas kāpums.

Karodziņš	Apraksts
STRONG_BASELINE_DIP	Amplifikācijas līknē jēdatu fluorescencei ir konstatēts straujš bāzīnijas kritums.
STRONG_NOISE	Konstatēts stiprs troksnis ārpus amplifikācijas līknes augšanas fāzes.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Konstatēts stiprs troksnis amplifikācijas līknes (eksponenciālas) augšanas fāzē.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Amplifikācijas līknē jēdatu fluorescencei konstatēta viļņota bāzīnija.

## 11. Brīdinājuma parauga karodziņi un jēdzienu skaidrojums

Karodziņš	Apraksts
CN Mbcr starp LOB un LOD	Apvienotā gēna kopiju skaits testa paraugam ir starp LOB un LOD vērtībām, un to aizstāj ar LOD vērtību.
CN Mbcr viens atkārtojums	Apvienotā gēna kopiju skaits testa paraugam tiek aprēķināts tikai vienā atkārtojumā un tiek dalīts ar 2.
CN Mbcr viens atkārtojums starp LOB un LOD	Apvienotā gēna kopiju skaits testa paraugam (aprēķināts tikai vienā atkārtojumā un dalīts ar 2) ir starp LOB un LOD vērtībām, un to aizstāj ar LOD vērtību.
IS-NCN (%) starp LOB un LOD	Normalizēto kopiju skaitu (starptautiskais mērogs) testa paraugam iegūst, pamatojoties uz apvienotā gēna kopiju skaita vērtību starp LOB un LOD.
IS-NCN (%) viens atkārtojums	Normalizēto kopiju skaitu (starptautiskais mērogs) testa paraugam iegūst, pamatojoties uz apvienotā gēna kopiju skaitu, kas aprēķināts tikai vienā atkārtojumā.
IS-NCN (%) viens atkārtojums starp LOB un LOD	Normalizēto kopiju skaitu (starptautiskais mērogs) testam iegūst, pamatojoties uz apvienotā gēna kopiju skaitu (aprēķināts tikai vienā atkārtojumā) starp LOB un LOD vērtībām.
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Procentuālā fluorescences izmaiņa šim paraugam attiecībā pret parauga stobriņu ar lielāko fluorescences izmaiņu ir zemāka par definēto robežu.
LOW_REACTION_EFFICIENCY	Reakcijas efektivitāte šim paraugam nav sasniegusi definēto robežu.
NCN (%) starp LOB un LOD	Normalizēto kopiju skaitu testa paraugam iegūst, pamatojoties uz apvienotā gēna kopiju skaita vērtību starp LOB un LOD.
NCN (%) viens atkārtojums	Normalizēto kopiju skaitu testa paraugam iegūst, pamatojoties uz apvienotā gēna kopiju skaitu, kas aprēķināts tikai vienā atkārtojumā.
NCN (%) viens atkārtojums starp LOB un LOD	Normalizēto kopiju skaitu testa paraugam iegūst, pamatojoties uz apvienotā gēna kopiju skaitu (aprēķināts tikai vienā atkārtojumā) starp LOB un LOD vērtībām.
SPIKE	Amplifikācijas līknē ir konstatēts neapstrādātu datu fluorescences pīķis, taču ārpus reģiona, kur tiek noteikta $C_T$ vērtība.

# Norādījumi par problēmu novēršanu

Šie norādījumi par problēmu novēršanu var palīdzēt novērst iespējamās problēmas. Stkāku informāciju skatiet arī lapā "Biežāk uzdotie jautājumi", kas pieejama mūsu tehniskā atbalsta centra vietnē: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). QIAGEN tehniskā atbalsta darbinieki vienmēr labprāt atbildēs uz visiem jūsu jautājumiem par šajā rokasgrāmatā sniegto informāciju un protokoliem vai par paraugu un analīzes tehnoloģijām (kontakthinformāciju skatīt uz aizmugurējā vāka vai vietnē [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Komentāri un ieteikumi

---

### RNS izolēšana

Lai novērstu problēmas saistībā ar RNS izdalīšanu no pilnasinīm, izmantojot RNeasy Midi Kit un Buffer EL, skatiet atbilstošās komplektu rokasgrāmatas.

### Nepietiekama RNS eluātā

Izmantots nepietiekams asiņu daudzums

Atkārtojiet RNS izolēšanu, izmantojot citus paraugus. Apsveriet iespēju apvienot abus eluātus un koncentrēt RNS, izmantojot RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat. Nr. 74204).

### Nepietiekama RNS eluātā

Lai nodrošinātu optimālu jutīgumu, RNS koncentrācijai jābūt 200 ng/μl

Izmantojiet RNeasy MinElute Cleanup Kit, (kat. Nr. 74204), lai koncentrētu paraugu, pēc tam pielāgojiet koncentrāciju līdz 200 ng/μl.

### Standarts, kontrole vai IS-Cal nav noteikts

- |   |   |
|---|---|
| a) pipetēšanas kļūda vai izlaisti reaģenti; stobriņa vai dobuma inversija   | Pārbaudiet pipetēšanas shēmu un reakcijas iestatījumu. Atkārtojiet PCR izpildi.   |
| b) neatbilstoša komplekta komponentu glabāšana                              | Glabājiet <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit no –30 °C līdz –15 °C temperatūrā un sargājiet qPCR Mix ABL1 un qPCR Mix MbcR no gaismas. Neizmantojiet vairāk par trim sasaldēšanas un atkausēšanas cikliem. |
| c) <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit derīguma termiņš ir beidzies | Pārbaudiet reaģentu uzglabāšanas apstākļus un derīguma termiņu (skatīt komplekta etiķeti) un, ja nepieciešams, izmantojiet jaunu komplektu.   |



## Komentāri un ieteikumi

### Nav signāla, tostarp nav signāla no kontrolēm

- |  |   |
|--|---|
| a) nav reakcijas stobriņa Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrumenta 1. pozīcijā | Vienmēr atcerieties ievietot paraugu rotora 1. pozīcijā. Pretējā gadījumā instruments kalibrāciju neveiks un tiks iegūti nepareizi fluorescences dati.  |
| b) pipetēšanas kļūda vai izlaisti reaģenti; stobriņa vai dobuma inversija    | Pārbaudiet pipetēšanas shēmu un reakcijas iestatījumu. Atkārtojiet PCR izpildi.   |
| c) neatbilstoša komplekta komponentu glabāšana                               | Glabājiet <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit no $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ līdz $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā un sargājiet praimerus un zondes maisījumus no gaismas. Neizmantojiet vairāk par trim sasaldēšanas un atkausēšanas cikliem. |
| d) <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit derīguma termiņš ir beidzies  | Pārbaudiet reaģentu uzglabāšanas apstākļus un derīguma termiņu (skatīt komplekta etiķeti) un, ja nepieciešams, izmantojiet jaunu komplektu.   |
| e) izvēlēts nepareizs noteikšanas kanāls                                     | Iestatiet noteikšanas kanālu kā Cycling Green vai 470 nm/510 nm.  |
| f) nav datu iegūšanas programmas   | Pārbaudiet cikla programmu. Skatiet 5. tabulu, 35. 35 PCR programmas katra renaturēšanas segmenta beigās atlasiet datu iegūšanas režīmu "Single" (viens).   |

### Fluorescences intensitāte mainās

- |  |   |
|--|---|
| Pipetēšanas kļūda vai izlaisti reaģenti; stobriņa vai dobuma inversija | Pārbaudiet pipetēšanas shēmu un reakcijas iestatījumu. Atkārtojiet PCR izpildi. |
|--|---|

### Fluorescences intensitāte ir pārāk zema

- |   |   |
|---|---|
| a) neatbilstoša komplekta komponentu glabāšana                          | Glabājiet <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit no $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ līdz $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā un sargājiet qPCR Mix ABL1 un qPCR Mix MbcR no gaismas. Neizmantojiet vairāk par trim sasaldēšanas un atkausēšanas cikliem. |
| b) <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR derīguma termiņš ir beidzies | Pārbaudiet reaģentu uzglabāšanas apstākļus un derīguma termiņu (skatīt komplekta etiķeti) un, ja nepieciešams, izmantojiet jaunu komplektu.   |
| c) ļoti zems mērķa RNS daudzums   | Pirms sākšanas vienmēr pārbaudiet RNS koncentrāciju.  |

## Komentāri un ieteikumi

---

### Negatīvā kontrole (H<sub>2</sub>O) uzrāda pozitīvu rezultātu

Savstarpēja kontaminācija, reaģentu kontaminācija, instrumenta kļūda, dobuma vai kapilāra inversija vai arī zondes noārdīšanās

Nomainiet visus kritiskos reaģentus vai izmantojiet jaunu komplektu.

Vienmēr rīkojieties ar paraugiem, komplekta komponentiem un palīgmateriāliem saskaņā ar vispārpieņemto praksi, lai novērstu savstarpēju kontamināciju.

Sargājiet qPCR Mix ABL1 un qPCR Mix MbcR no gaismas.

Pārbaudiet, vai fluorescences līknēs nav kļūdaini pozitīvu rādījumu.

Pārbaudiet reakcijas iestatījumu.

### Rezultātu interpretācija

Problēmu novēršanas informāciju saistībā ar Rotor-Gene Q MDx instrumentu un Rotor-Gene Q programmatūru vai Rotor-Gene AssayManager programmatūru v2.1, lūdzu, skatiet attiecīgajās lietotāja rokasgrāmatās.

## Kvalitātes kontrole

Visa komplekta kvalitātes kontrole tika veikta Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrumentā. Šis komplekts ir ražots saskaņā ar standartu ISO 13485. Analīzes sertifikāti pēc pieprasījuma ir pieejami vietnē [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Ierobežojumi

Šis komplekts ir paredzēts profesionālai lietošanai.

Produktu drīkst lietot tikai molekulārās bioloģijas metodikā īpaši instruēti, apmācīti darbinieki, kas pārzina šo tehnoloģiju.

Šis komplekts ir jāizmanto, ievērojot šajā rokasgrāmatā sniegtās instrukcijas un kombinācijā ar apstiprinātu instrumentu, kas norādīts sadaļā "Nepieciešamie materiāli, kas nav ietverti komplektā", 12.

---

Pievērsiet uzmanību derīguma termiņa datumiem, kas norādīti uz kastītes etiķetes. Nedrīkst izmantot komponentus, kam beidzies derīguma termiņš.

Visus *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit komplektā iekļautos reaģentus ir paredzēts lietot tikai ar citiem tā paša komplekta reaģentiem. Citu reaģentu vai reaģentu no citām partijām izmantošana var ietekmēt veikspēju.

Komplekts *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ir validēts tikai ar kāliju EDTA (K<sub>2</sub>EDTA) antikoagulētām pilnasinīm, kas ņemtas no pacientiem, kuriem diagnosticēta Filadelfijas hromosomu pozitīvās hroniskās fāzes (Ph+) p210 HML.

Komplekta *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit veikspēja tika noskaidrota, izmantojot RNeasy Midi Kit (kat. Nr. 75144), Buffer EL (kat. Nr. 79217) un RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat. Nr. 74204), kas izmantots RNS attīrīšanas un koncentrācijas darbībai.

PCR ar šo komplektu ir validēts tikai reakcija Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instruments.

Jebkura šī produkta izmantošana un/vai sastāvdaļu modificēšana ārpus etiķetē sniegtajiem norādījumiem anulēs QIAGEN atbildību.

Visi iegūtie diagnostikas rezultāti jāinterpretē kopā ar citiem klīniskiem vai laboratoriskiem konstatējumiem.

Lietotāju pienākums ir pārbaudīt sistēmas veikspēju attiecībā uz visām laboratorijā veiktajām procedūrām, kas nav ietvertas QIAGEN veikspējas pētījumos.

# Veiktspējas raksturojums

## Tukšo paraugu robeža

Tukšo paraugu robeža (Limit of Blank, LOB) tika noteikta, ievērojot CLSI/NCCLS EP17-2A standartu par veselu personu pilnasiņu paraugiem (septiņi paraugi, 12 mērījumi/divas partijas).

Noskaidrots, ka LOB ir vienāds ar BCR-ABL1 MbcR transkripta 1,02 kopijām.

## Konstatēšanas robeža

Noteikšanas robeža (Limit of Detection, LOD, jeb analītiskā jutība) tika noteikta, balstoties uz "Klasisko pieeju", kas aprakstīta standartā CLSI/NCCLS EP17-2A. Šajā pētījumā tika analizēti zināmie zemi pozitīvie paraugi (septiņi paraugi, 12 mērījumi/divas partijas).

Noskaidrots, ka LOD ir vienāds ar BCR-ABL1 MbcR transkripta 3,21 kopijām vai 0,0030 % IS-NCN.

## Linearitāte

Linearitāti noteica pēc CLSI/NCCLS EP6-A standarta ar vienu *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit partiju deviņos dažādos paraugos, kas sagatavoti, secīgi atšķaidot pozitīvo RNS, kas no šūnu līnijas ekstrahēta negatīvajā RNS, kas ekstrahēta no veseliem donoriem. Noteikšanu veica trim dažādām RNS ievadēm.

BCR-ABL1 MbcR transkripta kvantitatīvā noteikšana ir lineāra no LOD vērtības līdz 56 % IS-NCN, ja kvantitatīvā RNS parauga koncentrācija ir tuvu 200 ng/μl, kas ir analīzes ieteicamā ievade (kopējā ievade 3 μg).

Pie zemākas RNS ievades linearitātes diapazonu var samazināt.

## Atkārtojamība un reproducējamība

Precizitātes pētījums tika veikts saskaņā ar standartu CLSI/NCCLS EP5-A2. Testēšana tika veikta deviņiem dažādiem paraugiem, kas tika pārbaudīti 45 reizes divos atkārtojumos, veicot 45 pārbaudes 23 dienu laikā, tādējādi iegūstot 90 mērījumus vienam paraugam.

Precizitātes rezultāti ir apkopoti 12. tabulā.

### 12. Precizitātes rezultāti

Paraugs	Vidējais BCR-ABL1 Mbcr IS-NCN	SDR+	SDRUN++	SDTOTAL+++	CV <sub>TOTAL</sub>
S1	64,5243	4,3105	12,3610	13,0910	20,29 %
S2	36,1684	1,7104	5,9078	6,8581	18,96 %
S3	6,4876	0,4231	0,7857	1,0941	16,86 %
S4	0,7305	0,0512	0,0779	0,1178	16,12 %
S5	0,0754	0,0068	0,0073	0,0133	17,62 %
S6	0,0075	0,0016	0,0009	0,0022	28,81 %
S7	0,0036	0,0014	0,0002	0,0014	38,64 %
S8	0,0020	0,0010	0,0000	0,0010	48,71 %
S9	0,0011	0,0007	0,0000	0,0007	63,32 %

**CV<sub>TOTAL</sub>**: Variācijas koeficients kopējai precizitātei (BCR-ABL1 Mbcr IS-NCN); **SD**: standartnovirze; **R+**: Atkārtojamība; **RUN++**: Reproducējamība dažādās izpildēs; **S**: standarts; **KOPĀ+++**: Kopējā precizitāte (tostarp dažādos instrumentos, dažādiem operatoriem un dažādām partijām).

## Interferējošas vielas

Pētījuma dizains bija balstīts uz ieteikumiem, kas aprakstīti NCCLS standartā EP7-A2 "Interference Testing in clinical Chemistry". Potenciālās ietekmes uz PCR dēļ tika izvēlētas šādas vielas, kas var būt asins paraugos vai kas var tikt ievadītas RNS izdalīšanas laikā: (nekonjugēts bilirubīns, konjugēts bilirubīns, hemoglobīns [cilvēka], seruma albumīns [cilvēka], kālija pārpalikums EDTA [K2-EDTA], etanols).

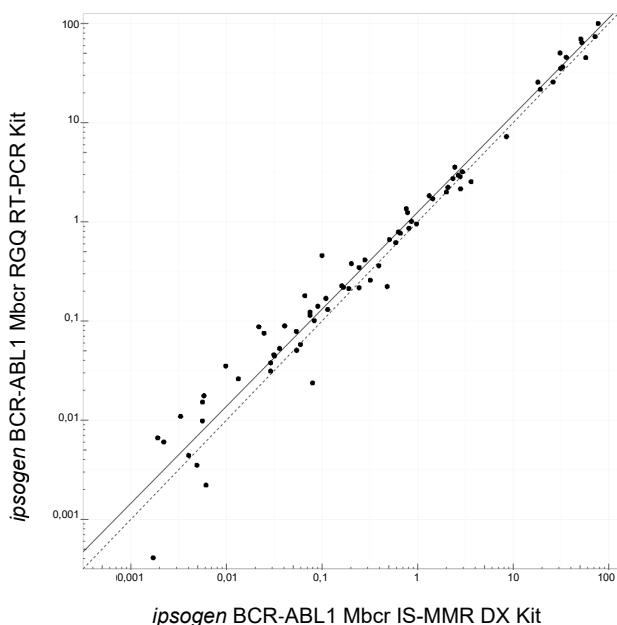
Iegūtie rezultāti neliecināja par šo vielu traucējošu iedarbību.

## Klīniskā validācija un metožu salīdzinājums

Lai salīdzinātu *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ar alternatīvām metodēm, tika veikti divi pētījumi.

1. pētījums: Ar *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit un *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX komplektu tika analizēti 76 RNS paraugi, kas iegūti no perifērām asinīm.

Deminga regresija salīdzināja ar abām metodēm izmērītos IS-NCN. Pastāvēja spēcīga saistība starp *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit un *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX ( $R^2= 0,97$ ), kā redzams 9. attēlā.



9. IS-NCN diagramma, kas iegūta ar *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit un *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit.

2. pētījums: 39 RNS paraugi, kas iegūti no to pacientu perifērajām asinīm, kuriem iepriekš tika diagnosticēta Ph+ HML un kuri tika ārstēti ar TKI, tika analizēti Francijas klīniskajā centrā, izmantojot *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit un laboratoriski izstrādātu testu (atsauces metode). Ar atsauces metodi varēja ziņot rezultātus, kas standartizēti starptautiskajā mērogā, izmantojot konversijas koeficientu.

Lai salīdzinātu ar abām metodēm iegūto klīnisko stāvokli, tika izveidota šāda neparedzēto nosacījumu tabula. Pastāvēja spēcīga saistība starp *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit un atsauces metodi (kopējā sakritība = 97,4 %), kā redzams 10. attēlā.

		Atsauces metode		n
		nav MR 4	MR 4 vai zemāk	
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit	nav MR 4	15	1	16
	MR 4 vai zemāk	0	23	23
n		15	24	39

10. Neparedzēto nosacījumu tabula, kurā salīdzināts *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit un laboratorijā izstrādāts, starptautiskajam mērogam standartizēts tests.

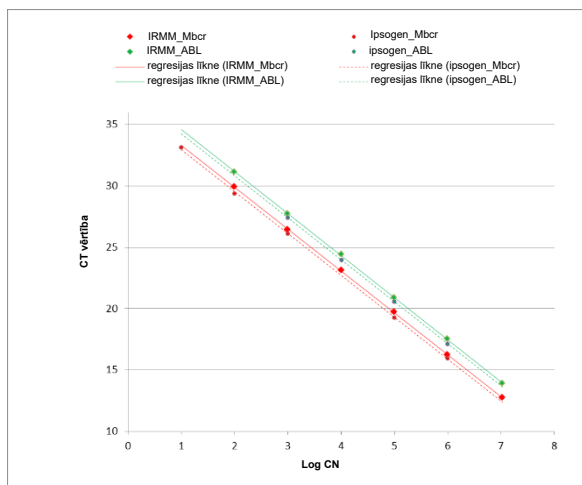
## Atbilstības pētījums: ERM-AD623 BCR-ABL1 vienas plazmīdas (IRMM) un *ipsogen* vienas plazmīdas (QIAGEN) standarts

Visjaunākās darba definīcijas par BCR-ABL1 MbcR molekulāro reakciju HML gadījumos ir devusi apvienība European LeukemiaNet/European Treatment Outcome Study (ELN/EUTOS) Molecular Monitoring Steering Group, iesakot izmantot ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmīdu, Institute for Reference Materials and Measurements, Beļģija (9).

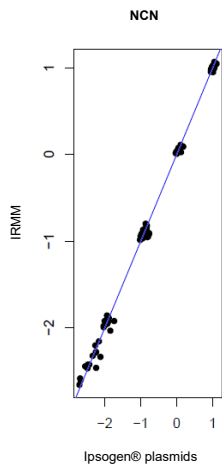
Lai ievērotu šo ieteikumu, QIAGEN veica atbilstības pētījumu, lai salīdzinātu *ipsogen* vairākmērķu vienu plazmīdu, kas tiek izmantota komplektā *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit (24) CE (kat. Nr. 670923), salīdzinot ar ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmīdu (IRMM).

Salīdzinājuma pamatā bija BCR-ABL1 MbcR/ABL1 normalizēto kopiju skaita attiecība (NCN), novērtējot divu standartu atšķaidījumus (*ipsogen* or ERM-AD623 BCR-ABL1) *ipsogen* komplektos iekļautajiem kontroles paraugiem, un Valsts bioloģisko standartu un kontroles institūta (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) sertificēts atsauces materiāls (8). Rezultāti rāda, ka abas standarta līknes ir izlīdzinātas (11. attēls) un NCN attiecības ir salīdzināmas (12. attēls).





11. *ipsogen* un ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmīdu salīdzinājums rāda, ka standartu līknes saskan.



12. *ipsogen* un ERM-AD623 plazmīdu NCN vērtības ir salīdzināmas.

QIAGEN pētījumā secināts, ka statistiski nozīmīgas atšķirības nav: ERM-AD623 BCR-ABL1 vienas plazmīdas un *ipsogen* vienas plazmīdas standarti uzrāda ekvivalentus rezultātus.

# Atsauces

## Citētās atsauces

1. Cross, N.C., White, H.E., Müller, M.C., Saglio, G., Hochhaus, A. (2012) Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **26**, 2172.
2. Mahon, F.X., Etienne, G. (2013) Deep molecular response in chronic myeloid leukemia: the new goal of therapy? *Clin. Cancer Res.* **20**, 310.
3. Baccarani, M., Deininger, M.W., Rosti, G., et al. (2013) European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* **122**, 872.
4. Rousselot, P., Charbonnier, A., Cony-Makhoul, P., et al. (2014) Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *J. Clin. Oncol.* **32**, 424.
5. Branford, S., Cross, N.C., Hochhaus, A., 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.
6. Branford, S., Fletcher, L., Cross, N.C., et al. (2008) Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* **112**, 3330.
7. Hughes, T., Deininger, M., Hochhaus, A., 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.
8. White, H.E., Matejtschuk, P., Rigsby, P., et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.
9. Cross, N.C., White, H.E., Colomer, D., et al. (2015) Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **29**, 999.

---

## Noderīgas atsauces

Baccarani, M., et al. (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **108**, 1809.












Beillard, E., V.H., 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.

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.

van der Velden, V.H., et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time qPCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.

# Simboli

Uz iepakojuma un marķējuma var būt tālāk norādītie simboli.

Simbols	Simbola skaidrojums
	Izlietot līdz
	In vitro diagnostikas medicīniskā ierīce
	Kataloga numurs
	Partijas numurs
	Materiāla numurs
	Globālais tirdzniecības identifikācijas numurs
	Temperatūras ierobežojums
	Ražotājs
	Sargāt no gaismas
	Skatīt lietošanas instrukcijas
	Uzmanību!

# Informācija par pasūtīšanu

Produkts	Saturs	Kat. Nr.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit (24)	24 reakcijām: ABL1 un BCR-ABL1 MbcR kvantitatīvi vienas plazmīdas standarti, zema un augsta pozitīvās kontroles, IS-MMR kalibrators, qPCR maisījums ABL1, qPCR maisījums MbcR, atgriezeniskā transkripcija un qPCR reaģenti.	670923
<b>Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instruments – paredzēts IVD validētai real-time PCR analīzei klīniskajos lietojumos</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cikleris un High-Resolution Melt (Augstas izšķirtspējas kušanas) analizators ar 5 kanāliem (zaļš, dzeltens, oranžs, sarkans, sārts) un HRM kanālu, klēpjdators, programmatūra, piederumi: ietver 1 gada garantiju detaļām un darbam, neietver instalāciju un apmācību	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cikleris un High-Resolution Melt (Augstas izšķirtspējas kušanas) analizators ar 5 kanāliem (zaļš, dzeltens, oranžs, sarkans, sārts), HRM kanāls, klēpjdators, programmatūra, piederumi: ietver 1 gada garantiju detaļām un darbam, instalāciju un apmācību.	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Programmatūra rutīnas testēšanai apvienojumā ar Rotor-Gene Q	9024203

Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	Vienas licences programmatūra instalēšanai vienā datorā	9025620
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Alumīnija bloks manuālai reakcijas iestatīšanai ar viena kanāla pipeti 72 x 0,1 ml stobriņos.	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	4 četru stobriņu 250 teststrēmeles un vāciņi 1000 reakcijām	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 teststrēmeles 4 stobriņiem un vāciņi 10 000 reakcijām	981106
<b>RNS izolēšana</b>		
RNeasy Midi Kit	50 RNeasy Midi Spin Column, paraugu ņemšanas stobriņi (15 ml), reaģenti un buferšķīdumi bez RNase. Summārās RNS izdalīšanai.	75144
Buffer EL	1000 ml Erythrocyte Lysis Buffer (Eritrocītu līzes buferšķīdums).	79217
RNeasy MinElute Cleanup Kit	50 RNeasy MinElute Spin Column, paraugu ņemšanas stobriņi (1,5 ml un 2 ml), reaģenti un buferšķīdumi bez RNase. RNS attīrīšanai un koncentrācijai ar nelieliem eluēšanas tilpumiem.	74204

Jaunāko informāciju un specifiskās atrunas par licencēšanu un produktiem skatiet attiecīgajā QIAGEN komplekta rokasgrāmatā vai lietotāja rokasgrāmatā. QIAGEN komplektu un lietotāja rokasgrāmatas ir pieejamas vietnē [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) var tās var pieprasīt QIAGEN tehniskā atbalsta centros vai pie vietējiem preču izplatītājiem.

# Rokasgrāmatas pārskatījumu vēsture

<b>Dokuments</b>	<b>Izmaiņas</b>	<b>Datums</b>
HB-1904_005	Sadaļu "Automatizētā analīze: qPCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrumentā ar 72 stobriņu rotoru un RGAM programmatūru" un "Rezultātu interpretācija RGAM programmatūrā".	2018. gada jūnijs

Šis produkts ir paredzēts lietošanai in vitro diagnostikā. Bez QIAGEN rakstiskas atļaujas QIAGEN produktus nedrīkst pārdot tālāk, izmainīt tālākpārdošanai vai izmantot, lai ražotu komerciālus izstrādājumus.

Šajā dokumentā pieejamā informācija var tikt mainīta bez iepriekšēja paziņojuma. QIAGEN neuzņemas atbildību par jebkādam kļūdām, kas var būt šajā dokumentā. Tiek uzskatīts, ka publicēšanas brīdī šis dokuments ir pilnīgs un precīzs. QIAGEN nekādā gadījumā nav atbildīgs par nejausiem, tīšiem, daudzkārtīgiem vai izrietošiem zaudējumiem, kas ir saistīti ar šī dokumenta izmantošanu vai rodas no tā izmantošanas.

QIAGEN produktiem tiek garantēta atbilstība noteiktajām specifiskajām. QIAGEN vienīgais pienākums un klienta vienīgais tiesiskās aizsardzības līdzeklis ir produkta nomaīņa bez maksas, ja produkti nedarbojas, kā norādīts.

Šī produkta iegāde ļauj pircejam to izmantot diagnostikas pakalpojumu sniegšanai cilvēka in vitro diagnostikā. Ar šo netiek piešķirts vispārējs patents vai cita veida licence, bet tikai šīs īpašās lietošanas tiesības.

Preču zīmes: QIAGEN®, *ipsogen*®, MinElute®, RNeasy®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Group); FAM™, SYBR® (Thermo Fisher Scientific Inc.); BHQ-1® (Biosearch Technologies, Inc); Excel® (Microsoft Corporation); TaqMan® (Roche Group).

#### **Ierobežotas licences līgums *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit**

Šī produkta izmantošana nozīmē, ka katra produkta pircejs vai lietotājs piekrīt tālāk sniegtajiem nosacījumiem.

1. Šo produktu drīkst lietot tikai saskaņā kopā ar produktu nodrošinātajiem protokoliem un šo rokasgrāmatu un tikai kopā ar sastāvdaļām, kas ietilpst šajā komplektā. Uzņēmums QIAGEN nepiešķir nekāda veida licenci uz nevienu no tā intelektuālajiem īpašumiem, lai šajā komplektā ietvertās sastāvdaļas izmantotu kopā ar jebkādam sastāvdaļām, kas neietilpst šajā komplektā, vai ar tām apvienotu, izņemot gadījumus, kas aprakstīti kopā ar produktu piegādātajos protokolos un šajā rokasgrāmatā, kā arī papildu protokolos, kas pieejami tīmekļa vietnē [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Dažus no šiem papildu protokoliem QIAGEN lietotājiem ir nodrošinājuši QIAGEN lietotāji. QIAGEN nav veicis šo protokolu rūpīgu testēšanu vai optimizēšanu. Uzņēmums QIAGEN nedz apliecina, nedz garantē, ka tie nepārkāpj trešo personu tiesības.
2. Uzņēmums QIAGEN nesniedz citas garantijas, izņemot skaidri norādītās licences, ka šis komplekts un/vai tā lietošana pārkāpj trešo pušu tiesības.
3. Šis komplekts un tā sastāvdaļas ir licencētas vienreizējai lietošanai, un tās nedrīkst izmantot atkārtoti, atjaunot vai pārdot tālāk.
4. QIAGEN īpaši atsakās no jebkādam citām tiesām vai netiešām licencēm, kas nav skaidri norādītas.
5. Komplekta pircejs un lietotājs piekrīt neveikt un neatļaut citiem veikt nekādas darbības, kas varētu izraisīt vai veicināt jebkuras no iepriekš aizliegtajām darbībām. Uzņēmums QIAGEN var pieprasīt šī ierobežotā licences līguma aizliegumu istenošanu jebkurā tiesā un atgūt visus savus izmeklēšanas un tiesas izdevumus, ieskaitot advokātu honorārus, kas radušies, īstenojot šo ierobežoto licences līgumu vai jebkuru no uzņēmuma intelektuālā īpašuma tiesībām saistībā ar komplektu un/vai tā komponentiem.

Atjauninātos licences nosacījumus skatiet vietnē [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

1114278LV 06/2018 HB-1904-005 © 2016 QIAGEN, visas tiesības aizsargātas.



---

Pasūtīšana [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Tehniskais atbalsts [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Tīmekļa vietne [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)