

# Manual *ipsogen*<sup>®</sup> BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit



Versiunea 1

**IVD**

Cantitativ în diagnosticare in vitro

Pentru utilizare cu instrumentele Rotor-Gene<sup>®</sup> Q,  
Applied Biosystems<sup>®</sup>, ABI PRISM<sup>®</sup> și LightCycler<sup>®</sup>



**REF** 670723



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
GERMANIA

**R3** **MAT** 1072509RO



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

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

### **QIAGEN stabilește standarde în următoarele domenii:**

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

Misiunea noastră este aceea de a vă permite să obțineți un succes excepțional și realizări ieșite din comun. Pentru mai multe informații, vizitați **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**.

# Cuprins

<b>Domeniul de utilizare</b>	<b>5</b>
<b>Rezumatul și explicarea produsului</b>	<b>5</b>
Contextul LMC	5
Monitorizarea bolii	5
<b>Principiul procedurii</b>	<b>7</b>
<b>Materiale furnizate</b>	<b>9</b>
Conținutul kitului	9
<b>Materiale necesare, dar nefurnizate</b>	<b>10</b>
<b>Avertismente și precauții</b>	<b>11</b>
Precauții generale	11
<b>Depozitarea și manipularea reactivilor</b>	<b>12</b>
<b>Manipularea și depozitarea probelor</b>	<b>12</b>
<b>Procedură</b>	<b>13</b>
Prepararea ARN-ului pentru probă	13
Protocol	
■ Transcriere inversă prin utilizarea SuperScript III Reverse Transcriptase	13
■ qPCR pe instrumente Rotor Gene Q MDx 5plex HRM sau Rotor-Gene Q 5plex HRM cu rotor cu 72 de tuburi	16
■ qPCR pe instrumente Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS și LightCycler 480	20
■ qPCR pe instrumente LightCycler 1.2, 1.5 și 2.0	26
<b>Interpretarea rezultatelor</b>	<b>30</b>
Principiul analizei datelor	30
Curbe standard și criteriile de control al calității aplicabile datelor brute	31
Numărul de copii normalizat (Normalized Copy Number, NCN)	33
Conversie IS și raportare MMR	34
Rezumatul criteriilor de calitate	36
Depanarea	36
<b>Controlul calității</b>	<b>37</b>
<b>Limitări</b>	<b>37</b>
<b>Caracteristici de performanță</b>	<b>37</b>
Limita de blank și limita de detecție	38

Liniaritate	38
Date de intrare	38
Precizie	38
Studiul concordanței: ERM-AD623 BCR-ABL1 cu o singură plasmidă (IRMM) comparativ cu standardele <i>ipsogen</i> cu o singură plasmidă (QIAGEN)	39
<b>Referințe</b>	<b>41</b>
<b>Simboluri</b>	<b>42</b>
<b>Date de contact</b>	<b>42</b>
<b>Informații pentru comandă</b>	<b>43</b>

## Domeniul de utilizare

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit este destinat cuantificării transcripțiilor BCR-ABL p210 b2a2 sau b3a2 în măduva osoasă sau probele de sânge periferic la pacienții cu leucemie acută limfoblastică (LAL) sau leucemie mieloidă cronică (LMC) diagnosticați anterior cu un eveniment cu gena de fuziune (Fusion Gene, FG) BCR-ABL MbcR. Testul este destinat evaluării nivelului de răspuns molecular; rezultatele pot fi utilizate pentru monitorizarea minimală a bolii reziduale.

## Rezumatul și explicarea produsului

### Contextul LMC

LMC aparține grupului de neoplasme mieloproliferative și se caracterizează în >90 % din cazuri prin prezența cromozomului Philadelphia (cromozomul Ph).

Acest cromozom este produsul unei translocări reciproce între brațele lungi ale cromozomilor 9 și 22, t(9;22), regiunea de regrupare a punctelor de ruptură (Breakpoint Cluster Region, BCR) fiind localizată pe cromozomul 22 și oncogena c-ABL provenind de la cromozomul 9. Gena de fuziune corespunzătoare, BCR-ABL, este transcrisă într-un ARNm de 8,5 kb, cu 2 variante de joncțiune b2a2 (40 % din cazuri) și b3a2 (55 % din cazuri). Aceasta codifică o proteină himerică, p210, cu activitate crescută a tirozin kinazei. Transcripțiile b2a3 și b3a3 reprezintă mai puțin de 5 % din cazuri. Un cromozom Ph poate fi detectat și la 35 % dintre pacienții adulți cu LAL.

Incidența anuală a LMC este de aproximativ 1-2 la 100.000, iar LMC reprezintă 20 % din leucemiile la adulți. Din punct de vedere clinic, aceasta se caracterizează printr-un exces de celule mioide care se diferențiază și funcționează normal. Pacienții cu LMC vor fi diagnosticați în 90-95 % din cazuri în faza cronică sau stabilă a bolii. Din punct de vedere istoric, într-o medie de 4 până la 6 ani, pacienții intrau într-o fază accelerată care ducea la criză blastică și leucemie acută, care este întotdeauna fatală. Apariția imatinibului și, mai recent, a inhibitorilor tirozin kinazei (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI) de generația a doua au schimbat dramatic cursul natural al bolii: cei mai mulți pacienți rămân acum în remisie și fac obiectul urmăririi pe termen lung și al monitorizării bolii.

### Monitorizarea bolii

Până în prezent, scopul tratamentului pentru LMC este acela de a obține o rată de supraviețuire de 100 % și negativitatea la cromozomul Ph. Monitorizarea bolii este, prin urmare, un instrument esențial pentru a evalua răspunsul la tratament și pentru a detecta recidiva timpurie pentru fiecare pacient în parte. În cadrul tratamentului cu TKI, pacienții evoluează în mod obișnuit de la remisie hematologică la citogenetică și apoi la remisie moleculară, corespunzătoare numărului descrescător de celule leucemice și transcripții BCR-ABL, așa cum este detaliat în Figura 1.

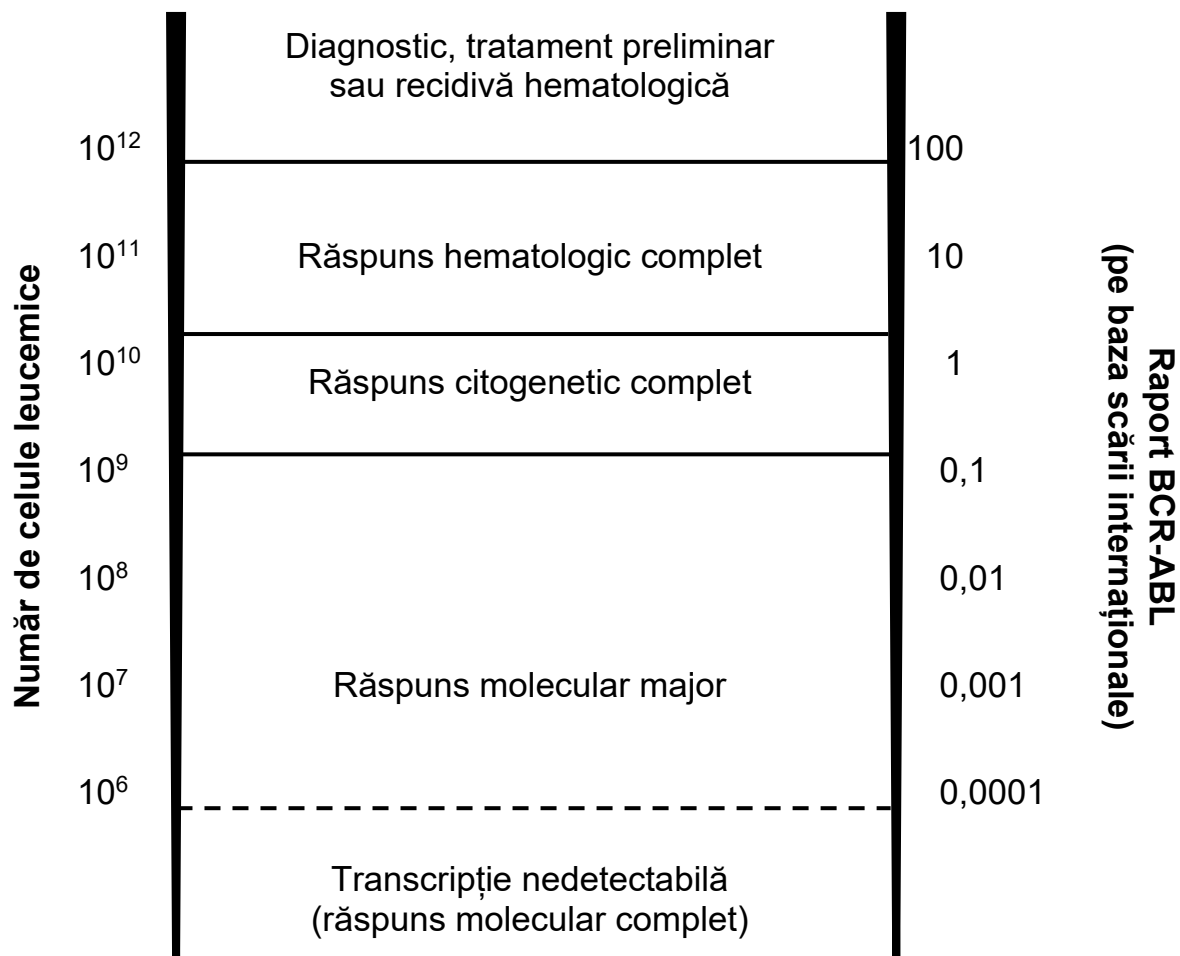


Figura 1. Adaptat din referința 1.

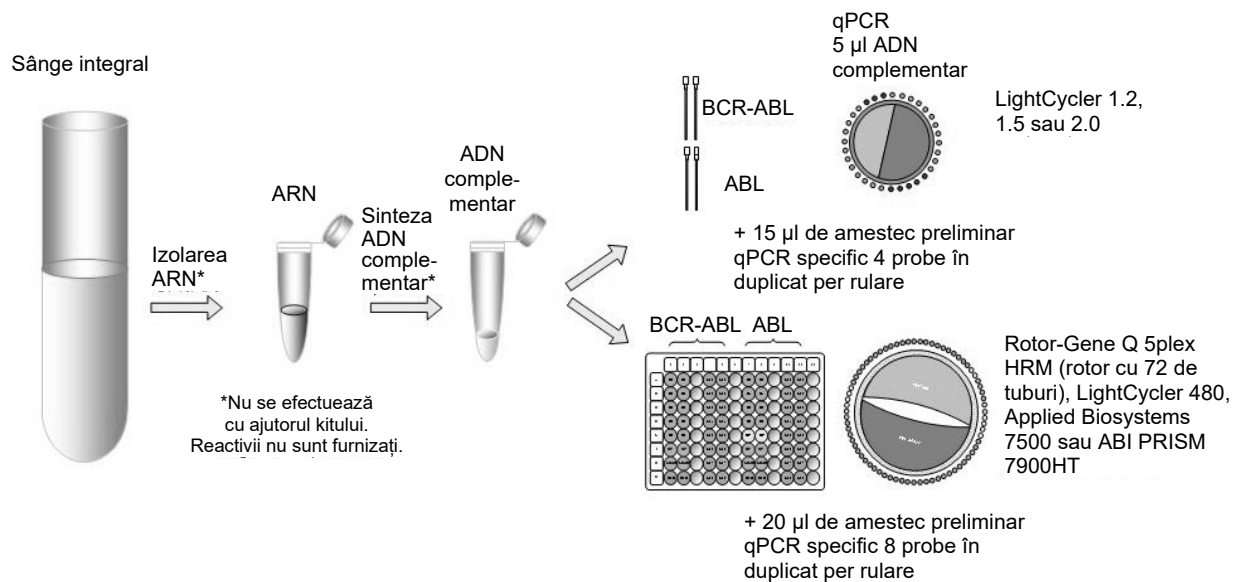
Metoda standard de estimare a încărcăturii tumorale la pacienții cu LMC este analiza citogenetică convențională (bandare G) pe metafazele măduvei osoase (MO). Răspunsul citogenetic este evaluat pe cel puțin 20 de metafaze ale măduvei. Nivelul răspunsului citogenetic este estimat pe procentul de metafaze pozitive la cromozomul Ph (consultați Tabelul 1, referința 2) Totuși, această evaluare depinde de performanțele de laborator și are o sensibilitate scăzută, de 5 % atunci când sunt analizate 20 de metafaze.

Reacția cantitativă de polimerizare în lanț (quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) în timp real, care cuantifică ARNm BCR-ABL MbcR pe probe de sânge periferic (SP) este acum parte a tehnicilor de monitorizare a bolii pentru LMC sub tratament. Aceasta este mai puțin invazivă decât citogenetica convențională pe metafazele măduvei osoase, dar mai sensibilă.

Recomandările pentru monitorizarea bolii LMC au fost, de asemenea, actualizate recent pentru a include noi dovezi clinice din studiile clinice, precum și obiective și instrumente îmbunătățite de monitorizare a bolii. Cele mai recente recomandări privind definirea răspunsului și monitorizarea pacienților tratați cu imatinib provin de la experții ELN (2).

Din punct de vedere tehnic, experții internaționali au depus eforturi pentru a armoniza testarea și raportarea Mbc BCR-ABL (3-5). În plus, un panel de referință a fost validat recent sub auspiciile OMS, pentru a permite o simplă standardizare a cuantificării BCR-ABL (6).

## Principiul procedurii



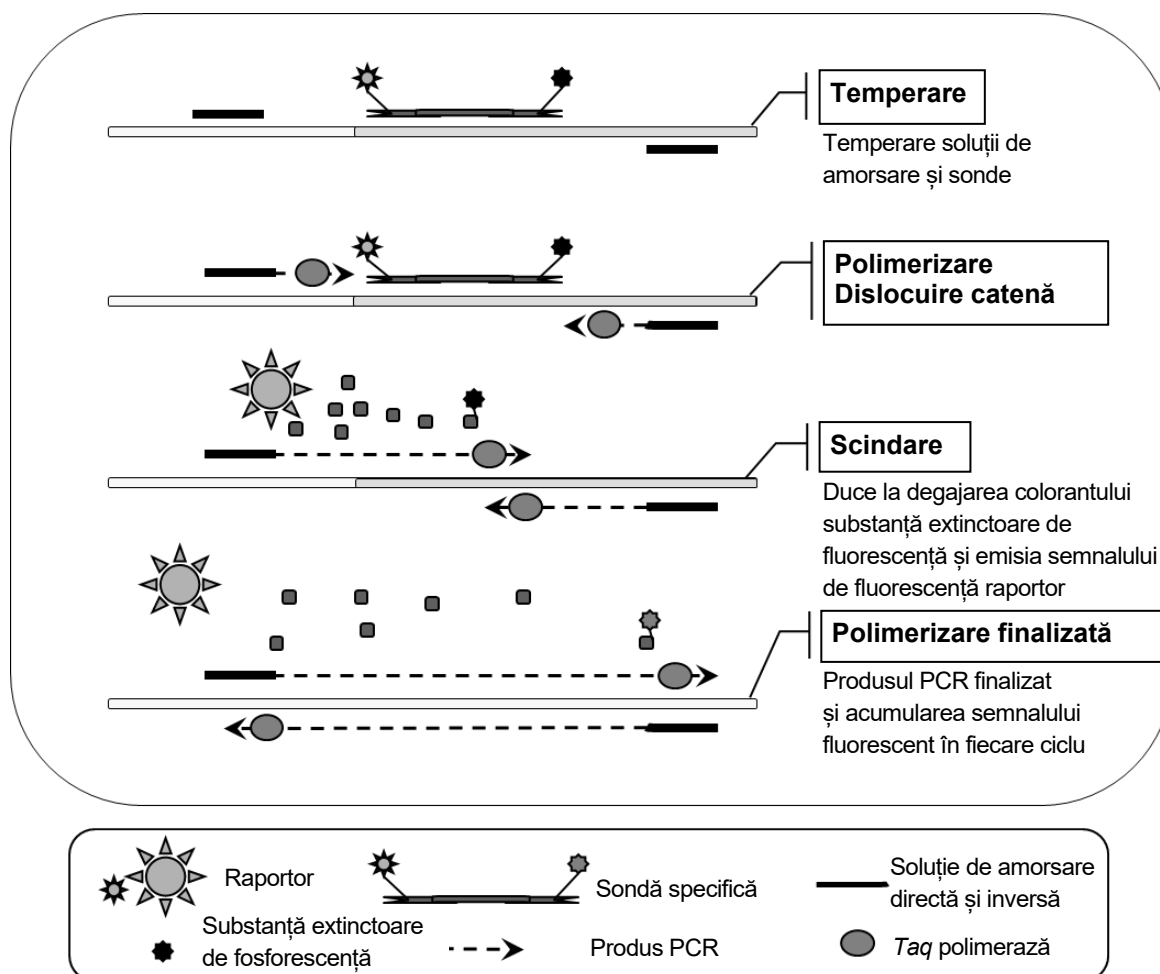
**Figura 2. Izolarea ARN, sinteza ADN complementar și qPCR.**

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

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

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

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



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



## Materiale furnizate

### Conținutul kitului

<b>ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Nr. de catalog</b>		<b>670723</b>
<b>Număr de reacții</b>		<b>24</b>
High Positive RNA Control (Substanță de control ARN puternic pozitivă)		3 x 10 µl
IS-MMR Calibrator (Calibrator IS-MMR)		3 x 10 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Diluție standard cu plasmidă unică MbcR și ABL) ( $10^1$ copii/5 µl)	SP1-BCR-ABL MbcR și ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Diluție standard cu plasmidă unică MbcR și ABL) ( $10^2$ copii/5 µl)	SP2-BCR-ABL MbcR și ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Diluție standard cu plasmidă unică MbcR și ABL) ( $10^3$ copii/5 µl)	SP3-BCR-ABL MbcR și ABL	70 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Diluție standard cu plasmidă unică MbcR și ABL) ( $10^4$ copii/5 µl)	SP4-BCR-ABL MbcR și ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Diluție standard cu plasmidă unică MbcR și ABL) ( $10^5$ copii/5 µl)	SP5-BCR-ABL MbcR și ABL	70 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Diluție standard cu plasmidă unică MbcR și ABL) ( $10^6$ copii/5 µl)	SP6-BCR-ABL MbcR și ABL	70 µl
Primers and Probe Mix ABL (Amestec de soluții de amorsare și sonde ABL)*	PPC-ABL 25x	110 µl
Primers and Probe Mix BCR-ABL MbcR Fusion Gene (Amestec de soluții de amorsare și sonde genă de fuziune BCR-ABL MbcR)†	PPF-MbcR 25x	110 µl
Manual ipsogen <i>BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit</i> (limba engleză)		1

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

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

**Notă:** Amestecați ușor și centrifugați pentru scurt timp standardele (SP1-SP6) și amestecurile de soluții de amorsare și sonde înainte de utilizare.

## Materiale necesare, dar nefurnizate

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

### Reactivi

- Reactivi pentru purificarea ARN: Reactivii validați sunt RNeasy® Midi Kit (QIAGEN, nr. cat. 75144) sau TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc, nr. cat. 15596018 sau 15596026)
- Apă de calitate PCR fără nuclează
- Soluție tampon și Taq ADN-polimerază: Reactivii validați sunt *Premix Ex Taq™* DNA Polymerase (Perfect Real Time) (TaKaRa, nr. cat. RR039A) și *Premix Ex Taq* DNA Polymerase (Probe qPCR) (TaKaRa, nr. cat. RR390A). Ambii includ amestec master mix 2x Taq ADN polimerază și coloranți de referință ROX™
- Reactivi pentru revers-transcriere: Reactivii validați sunt *ipsogen* RT Kit, care include revers-transcriptază, 5x RT buffer, 100 mM DTT, inhibitor de RNază, soluție de amorsare aleatorie și dNTPs (QIAGEN, nr. cat. 679923); sau SuperScript® III Reverse Transcriptase, include revers-transcriptază, 5x first-strand buffer și 100 mM DTT (Thermo Fisher Scientific Inc., nr. cat. 18080044)
- Când utilizați SuperScript III, sunt necesari următorii reactivi suplimentari:
  - Inhibitor de RNază: Reactivul validat este RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Thermo Fisher Scientific Inc., nr. cat. 10777019)
  - Set de dNTPs, calitate PCR
  - Nonamer aleatoriu

### Consumabile

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

### Echipamente

- Micropipete\* dedicate pentru PCR (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)
- Centrifugă de banc\* cu rotor pentru eprubete de reacție de 0,2 ml/0,5 ml (capabile să atingă 10.000 rot/min)

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

- Instrument pentru real-time PCR:\* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM sau alt instrument Rotor-Gene; LightCycler 1.2, 1.5, 2.0 sau 480; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; ABI PRISM 7900HT SDS și materiale specifice asociate
- Termociclor\* sau baie de apă\* (etapa de transcriere inversă)

## Avertismente și precauții

A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro

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

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

## Precauții generale

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

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

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

Acordați o atenție extremă, pentru a preveni următoarele situații:

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

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

Prin urmare, recomandăm următoarele:

- Folosiți aparatură de laborator fără nuclează (de exemplu, pipete, vârfuri de pipetă, flacoane de reacție) și purtați mănuși când efectuați testul.
- Utilizați vârfuri de pipetă noi, rezistente la aerosoli, pentru toate etapele de pipetare pentru a evita contaminarea încrucișată a probelor și a reactivilor.
- Pregătiți amestecul Master Mix pre-PCR cu material dedicat (pipete, vârfuri etc.) într-o zonă dedicată, în care nu sunt introduse matrice ADN (ADN complementar, ADN, plasmidă). Adăugați șablonul într-o zonă separată (de preferință, într-o cameră separată) cu material specific (pipete, vârfuri etc.).
- Manipulați standardele (SP1-SP6) într-o cameră separată.

## Depozitarea și manipularea reactivilor

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

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

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

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

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

## Manipularea și depozitarea probelor

Probele de sânge integral trebuie anticoagulate cu EDTA potasiu și păstrate la 2-8 °C timp de cel mult 5 zile înainte de extracția ARN.

## Procedură

### Prepararea ARN-ului pentru probă

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

### Protocol: Transcriere inversă prin utilizarea SuperScript III Reverse Transcriptase

Acest protocol este destinat transcrierii inverse prin utilizarea SuperScript III Reverse Transcriptase. La utilizarea *ipsogen* RT Kit, urmați protocolul din Manualul *ipsogen RT Kit*.

#### Operațiuni care trebuie executate înainte de începere

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

#### Procedură

1. Decongelați toate componentele necesare și așezați-le pe gheață.
2. Amestecați bine (nu vortexați) și centrifugați pentru scurt timp (aproximativ 10 s, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului). Apoi păstrați-le pe gheață.
3. Ajustați probele de ARN la 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Pipetați 10  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}$ ) din fiecare probă de ARN în tuburi separate, etichetate. Pipetați 10  $\mu\text{l}$  de substanță de control ARN puternic pozitivă, 10  $\mu\text{l}$  de calibrator IS-MMR și 10  $\mu\text{l}$  de apă fără nuclează (ca substanță de control negativă RT) în tuburi separate, etichetate și procesați-le în paralel cu probele de ARN, conform descrierii de mai jos.
4. Incubați fiecare probă, substanță de control și calibrator (câte 10  $\mu\text{l}$ ) timp de 5 min la  $65^{\circ}\text{C}$  și răciți-le imediat pe gheață timp de 5 min.
5. Centrifugați pentru scurt timp (aproximativ 10 s, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului). Apoi păstrați-le pe gheață.
6. Preparați următorul amestec RT în funcție de numărul de probe, substanțe de control și calibratoare procesate (Tabelul 1).

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

† Densitatea optică măsurată la 260 și 280 nm: Densitatea optică de la 1,0 la 260 nm este echivalentă cu aproximativ 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ARN monocatenar. Un raport  $A_{260}/A_{280}$  cuprins între 1,8 și 2,1 indică ARN ultra purificat.

**Tabelul 1. Prepararea amestecului RT**

<b>Componentă</b>	<b>Volum per probă (µl)</b>	<b>Concentrație finală</b>
First-Strand Buffer, 5x (furnizat împreună cu SuperScript III Reverse Transcriptase)	5,0	1x
dNTPs (câte 10 mM, de preparat în prealabil și de depozitat la –20 °C în părți alicote)	2,0	0,8 mM
Nonamer aleatoriu (100 µM)	5,25	21 µM
RNaseOUT (40 U/µl)	0,5	0,8 U/µl
SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1,0	8 U/µl
DTT (furnizat împreună cu SuperScript III Reverse Transcriptase)	1,25	–
Probă ARN încălzită, substanță de control sau calibrator IS-MMR (de adăugat la pasul 7)	10,0	40 ng/µl
Volum final	25,0	–

- 7. Pipetați câte 15 µl de amestec RT în fiecare eprubetă PCR. Apoi adăugați 10 µl (1 µg) probă ARN, substanță de control sau calibrator (de la pasul 4).**
- 8. Amestecați cu atenție (nu vortexați) și centrifugați pentru scurt timp (aproximativ 10 s, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului).**
- 9. Programați termociclorul cu programul de transcriere inversă indicat în Tabelul 2.**

**Tabelul 2. Profilul de temperatură**

<b>Transcriere inversă 1</b>	Temperature (Temperatură): 25 °C Time (Timp): 10 min
<b>Transcriere inversă 2</b>	Temperature (Temperatură): 50 °C Time (Timp): 60 min
<b>Inactivare</b>	Temperature (Temperatură): 85 °C Time (Timp): 5 min
<b>Răcire</b>	Temperature (Temperatură): 4 °C Time (Timp): 5 min

- 10. Așezați tuburile în termociclor și porniți programul de termociclare, așa cum este indicat în Tabelul 2.**
- 11. La finalizarea programului, centrifugați tuburile pentru scurt timp (aproximativ 10 s, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului). Păstrați tuburile pe gheață sau la –20 °C până când se efectuează qPCR, conform următoarelor protocoale, în funcție de instrumentul qPCR pe care îl dețineți.**

**Notă:** Pentru instrumentele LightCycler 1.2, 1.5 și 2.0, fiecare preparat RT furnizează ADN complementar pentru două rulări qPCR.

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

Dacă utilizați acest instrument, vă recomandăm să efectuați toate măsurătorile în duplicat, așa cum este indicat în Tabelul 3. Kitul este conceput pentru testarea a opt probe diferite de ADN complementar în același experiment de trei ori.

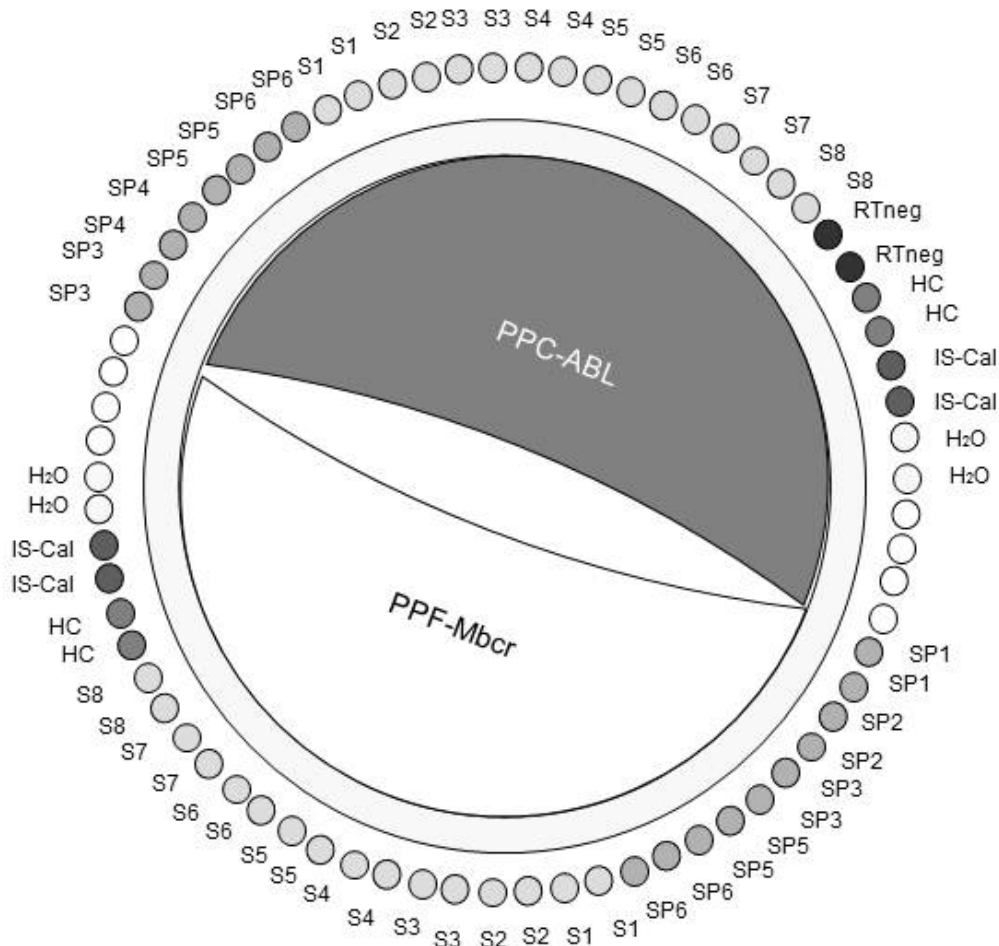
**Tabelul 3. Număr de reacții pentru instrumentele Rotor-Gene Q cu rotor cu 72 de tuburi**

Probele	Reacții
<b>Cu amestecul de soluții de amorsare și sonde ABL (PPC-ABL) (32 reacții)</b>	
8 probe de ADN complementar	8 x 2 reacții
1 substanță de control puternic pozitivă ADN complementar	2 reacții
1 calibrator IS-MMR ADN complementar	2 reacții
Standarde cu o singură plasmidă	2 x 4 reacții (SP3, SP4, SP5 și SP6, fiecare testat în duplicat)
Substanță de control negativă la RT	2 reacții
Substanță de control apă	2 reacții
<b>Cu amestecul de soluții de amorsare și sonde BCR-ABL Mbcr (PPF-Mbcr) (32 reacții)</b>	
8 probe de ADN complementar	8 x 2 reacții
1 substanță de control puternic pozitivă ADN complementar	2 reacții
1 calibrator IS-MMR ADN complementar	2 reacții
Standarde cu o singură plasmidă	2 x 5 reacții (SP1, SP2, SP3, SP5 și SP6, fiecare testat în duplicat)
Substanță de control apă	2 reacții



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

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



**Figura 4. Configurarea sugerată a rotorului pentru un experiment efectuat cu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit.** SP1-SP6: Standarde BCR-ABL Mbcr și ABL; HC: substanță de control puternic pozitivă ADN complementar; IS-Cal: calibrator IS-MMR; RTneg: substanță de control negativă RT; S: probă de ADN complementar; H<sub>2</sub>O: substanță de control apă.

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

Umpleți toate celelalte poziții cu tuburi goale.

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

**Notă:** Toate etapele vor fi efectuate pe gheață.

## Procedură

1. Decongeleți toate componentele necesare și așezați-le pe gheață.
2. Vortexați standardele, PPF-Mbcr și tuburile PPC-ABL și centrifugați pentru scurt timp (aproximativ 10 s, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului).
3. Preparați următorul amestec qPCR în funcție de numărul de probe procesate.

Toate concentrațiile se referă la volumul final al reacției.

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

**Tabelul 4. Prepararea amestecului qPCR**

Componentă	1 reacție ( $\mu$ l)	ABL: 32+1 reacții ( $\mu$ l)	BCR-ABL Mbcr: 32+1 reacții ( $\mu$ l)	Concentrație finală
<i>Premix Ex Taq</i> , 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Amestec de soluții de amorsare și sonde, 25x	1	33	33	1x
Apă de calitate PCR fără nuclează	6,5	214,5	214,5	–
Probă (de adăugat la pasul 5)	5	Câte 5	Câte 5	–
Volum total	25	Câte 25	Câte 25	–

4. Distribuți 20  $\mu$ l de amestec qPCR preliminar per tub.
5. Într-o zonă de laborator diferită și cu echipament dedicat, adăugați 5  $\mu$ l de produs RT (ADN complementar, 200 ng echivalent ARN) obținut în transcrierea inversă (consultați „Protocol: Transcriere inversă prin utilizarea SuperScript III Reverse Transcriptase”, pagina 13) în tubul corespunzător (volum total 25  $\mu$ l).
6. Amestecați ușor, prin pipetare pe verticală.

7. Închideți toate tuburile și așezați-le în termociclor, conform recomandărilor producătorului.
8. Programați instrumentul Rotor-Gene Q cu programul de termociclare, așa cum este indicat în Tabelul 5.

**Tabelul 5. Profilul de temperatură**

<b>Modul de analiză</b>	Cuantificarea
<b>Hold 1 (Reținere 1)</b>	Temperature (Temperatură): 95 °C Time (Timp): 10 s
<b>Cycling (Repetare ciclu)</b>	50 times (50 de ori) 95 °C timp de 5 s 60 °C timp de 30 s cu achiziție de fluorescență FAM pe canalul Green: Unic
<b>Hold 2 (Reținere 2)</b>	Temperature (Temperatură): 36 °C Time (Timp): 1 min

9. Faceți clic pe „Gain Optimisation” (Optimizare amplificare) în caseta de dialog „New Run Wizard” (Expertul pentru testare nouă) pentru a deschide dialogul „Auto-Gain Optimisation Setup” (Configurarea optimizării amplificării automate). Setați intervalul pentru canalul Green de la „5 FI” pentru „Min Reading” (Citire minimă) la „10 FI” pentru „Max Reading” (Citire maximă) și intervalul acceptabil de amplificare de la -10 la 10.
10. Bifați caseta „Perform Optimization Before 1st Acquisition” (Efectuarea optimizării înainte de prima achiziție) și închideți caseta de dialog „Auto-Gain Optimization Setup” (Configurarea optimizării amplificării automate).
11. Porniți programul de termociclare.
12. Selectați „Slope Correct” (Corecție pantă) pentru analiză. Vă recomandăm să setați pragul la 0,03.

## Protocol: qPCR pe instrumente Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS și LightCycler 480

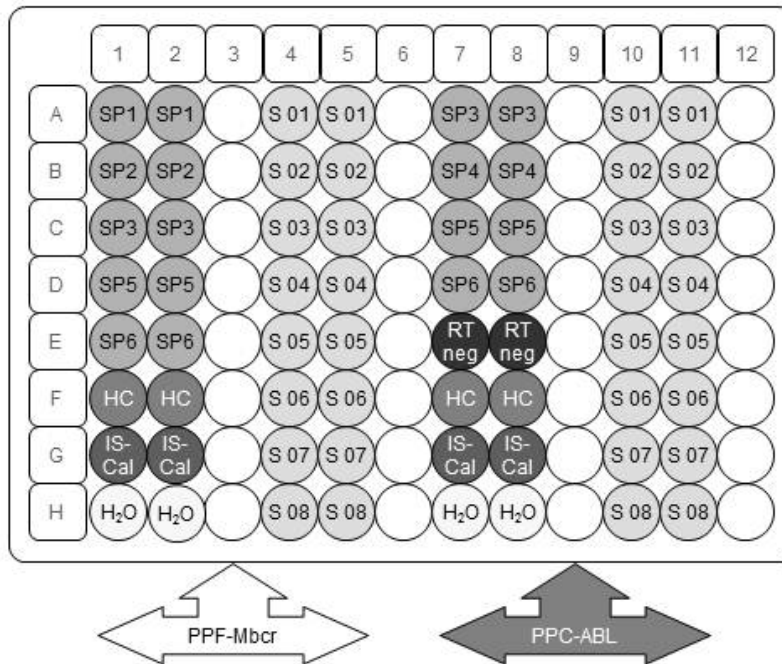
Dacă utilizați echipament qPCR cu plăci cu 96 de godeuri, vă recomandăm să efectuați toate măsurătorile în duplicat, așa cum este indicat în Tabelul 6. Kitul este conceput pentru testarea a opt probe diferite de ADN complementar în același experiment de trei ori.

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

Probele	Reacții
<b>Cu amestecul de soluții de amorsare și sonde ABL (PPC-ABL) (32 reacții)</b>	
8 probe de ADN complementar	8 x 2 reacții
1 substanță de control puternic pozitivă ADN complementar	2 reacții
1 calibrator IS-MMR ADN complementar	2 reacții
Standarde cu o singură plasmidă	2 x 4 reacții (SP3, SP4, SP5 și SP6, fiecare testat în duplicat)
Substanță de control negativă la RT	2 reacții
Substanță de control apă	2 reacții
<b>Cu amestecul de soluții de amorsare și sonde BCR-ABL Mbcr (PPF-Mbcr) (32 reacții)</b>	
8 probe de ADN complementar	8 x 2 reacții
1 substanță de control puternic pozitivă ADN complementar	2 reacții
1 calibrator IS-MMR ADN complementar	2 reacții
Standarde cu o singură plasmidă	2 x 5 reacții (SP1, SP2, SP3, SP5 și SP6, fiecare testat în duplicat)
Substanță de control apă	2 reacții

## Procesarea probelor pe instrumentele Applied Biosystems, ABI PRISM și LightCycler 480

Vă recomandăm să testați cel puțin 8 probe de ADN complementar în același experiment pentru a optimiza utilizarea standardelor și a amestecurilor de soluții de amorsare și sonde. Schema plăcilor din Figura 5 prezintă un astfel de experiment exemplificativ.



**Figura 5. Configurarea sugerată a plăcii pentru un experiment efectuat cu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit.** SP1-SP6: Standarde BCR-ABL Mbcr și ABL; HC: substanță de control puternic pozitivă ADN complementar; IS-Cal: calibrator IS-MMR; RTneg: substanță de control negativă RT; S: probă de ADN complementar; H<sub>2</sub>O: substanță de control apă.

## qPCR pe instrumente Applied Biosystems, ABI PRISM sau LightCycler 480

**Notă:** Toate etapele vor fi efectuate pe gheață.

### Procedură

1. Decongețați toate componentele necesare și așezați-le pe gheață.
2. Vortexați standardele, ROX, PPF-Mbcr și tuburile PPC-ABL și centrifugați pentru scurt timp (aproximativ 10 s, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului).
3. Preparați următorul amestec qPCR în funcție de numărul de probe procesate. Dacă utilizați echipament qPCR cu plăci cu 96 de godeuri, vă recomandăm să efectuați toate măsurătorile în duplicat.

Toate concentrațiile se referă la volumul final al reacției.

Tabelul 7 descrie schema de pipetare pentru prepararea unui amestec de reactivi pentru instrumentele Applied Biosystems și ABI PRISM, calculată pentru a obține un volum final de reacție de 25 μl. Tabelul 8 descrie schema de pipetare pentru prepararea unui amestec de reactivi pentru instrumentul LightCycler 480, calculată pentru a obține un volum final de reacție de 25 μl. Poate fi preparat un amestec preliminar, în funcție de numărul de reacții, folosind același amestec de soluții de amorsare și sonde (PPC-ABL sau PPF-Mbcr). Sunt incluse volume suplimentare pentru a compensa eroarea de pipetare.

**Tabelul 7. Prepararea amestecului qPCR pentru instrumentele Applied Biosystems și ABI PRISM**

<b>Componentă</b>	<b>1 reacție (μl)</b>	<b>ABL: 32+1 reacții (μl)</b>	<b>BCR-ABL Mbcr: 32+1 reacții (μl)</b>	<b>Concentrație finală</b>
<i>Premix Ex Taq</i> , 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Amestec de soluții de amorsare și sonde, 25x	1	33	33	1x
Colorant ROX I, 50x (ABI PRISM 7900HT) sau colorant ROX II, 50x (Applied Biosystems 7500)	0,5	16,5	16,5	1x
Apă de calitate PCR fără nuclează	6	198	198	–
Probă (de adăugat la pasul 5)	5	Câte 5	Câte 5	–
<b>Volum total</b>	<b>25</b>	<b>Câte 25</b>	<b>Câte 25</b>	<b>–</b>

**Tabelul 8. Prepararea amestecului qPCR pentru LightCycler 480**

<b>Componentă</b>	<b>1 reacție (μl)</b>	<b>ABL: 32+1 reacții (μl)</b>	<b>BCR-ABL Mbc: 32+1 reacții (μl)</b>	<b>Concentrație finală</b>
<i>Premix Ex Taq, 2x</i>	12,5	412,5	412,5	1x
Amestec de soluții de amorsare și sonde, 25x	1	33	33	1x
Apă de calitate PCR fără nuclează	6,5	214,5	214,5	–
Probă (de adăugat la pasul 5)	5	Câte 5	Câte 5	–
Volum total	25	Câte 25	Câte 25	–

4. Distribuți 20 μl de amestec qPCR preliminar per godeu.
5. Într-o zonă de laborator diferită și cu echipament dedicat, adăugați 5 μl de produs RT (ADN complementar, 200 ng echivalent ARN) obținut în transcrierea inversă (consultați „Protocol: Transcriere inversă prin utilizarea SuperScript III Reverse Transcriptase”, pagina 13) în godeul corespunzător (volum total 25 μl).
6. Amestecați ușor, prin pipetare pe verticală.
7. Închideți placa și centrifugați pentru scurt timp (300 x g, aproximativ 10 s).
8. Așezați placa în termociclor, conform recomandărilor producătorului. Programați termociclorul în programul de termociclare, așa cum este indicat în Tabelul 9 pentru instrumentele Applied Biosystems și ABI PRISM sau în Tabelul 10 pentru Instrumentul LightCycler 480.

**Tabelul 9. Profilul temperaturii pentru instrumentele Applied Biosystems și ABI PRISM**

<b>Modul de analiză</b>	Curba standard – Cuantificare absolută
<b>Hold 1 (Reținere 1)</b>	Temperature (Temperatură): 95 °C Time (Timp): 10 s
<b>Cycling (Repetare ciclu)</b>	50 times (50 de ori) 95 °C timp de 5 s 60 °C timp de 30 s cu achiziția fluorescenței FAM: Unic; substanță extincătoare de fluorescență: TAMRA
<b>Hold 2 (Reținere 2)</b>	Temperature (Temperatură): 36 °C Time (Timp): 1 min

**Tabelul 10. Profilul temperaturii pentru instrumentul LightCycler 480**

<b>Modul de analiză</b>	Cuantificare absolută („Abs Quant”)
<b>Formate de detecție</b>	Selectați „Simple Probe” (Sondă simplă) în fereastra Detection formats (Formate de detecție)
<b>Hold 1 (Reținere 1)</b>	Temperature (Temperatură): 95 °C Time (Timp): 10 s
<b>Cycling (Repetare ciclu)</b>	50 times (50 de ori) 95 °C timp de 5 s 60 °C timp de 30 s cu achiziția fluorescenței FAM corespunzătoare intervalului (483-533 nm) pentru LC versiunea 01 și (465-510 nm) pentru LC versiunea 02
<b>Hold 2 (Reținere 2)</b>	Temperature (Temperatură): 36 °C Time (Timp): 1 min



- 9. Pentru Applied Biosystems 7500 și ABI PRISM 7900HT SDS, parcurgeți etapa 9a. Pentru instrumentul LightCycler 480, parcurgeți etapa 9b.**
- 9a. Applied Biosystems și ABI PRISM: Vă recomandăm un prag setat la 0,1 în etapa de analiză a instrumentului. Porniți programul de ciclare, așa cum este indicat în Tabelul 9.**
- 9b. Instrumentul LightCycler 480: Vă recomandăm un mod de analiză de tip Fit point cu fundal la 2,0 și prag la 2,0. Porniți programul de termociclare, așa cum este indicat în Tabelul 10.**

## Protocol: qPCR pe instrumente LightCycler 1.2, 1.5 și 2.0

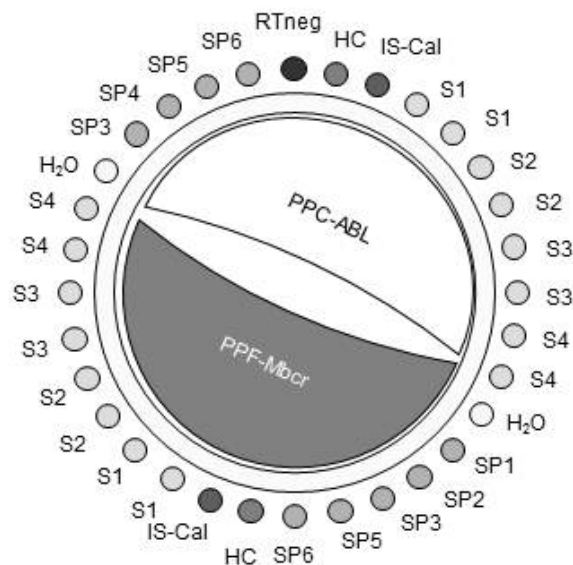
Dacă utilizați instrumente cu capilare, recomandăm măsurarea probelor în duplicat și a substanțelor de control o singură dată, așa cum este indicat în Tabelul 11. Kitul este conceput pentru testarea a patru probe diferite de ADN complementar în același experiment de șase ori.

**Tabelul 11. Număr de reacții pentru instrumentele LightCycler 1.2, 1.5 și 2.0**

Probele	Reacții
<b>Cu amestecul de soluții de amorsare și sonde ABL (PPC-ABL) (16 reacții)</b>	
4 probe de ADN complementar	4 x 2 reacții
1 substanță de control puternic pozitivă ADN complementar	1 reacție
1 calibrator IS-MMR ADN complementar	1 reacție
Standarde cu o singură plasmidă	1 x 4 reacții (SP3, SP4, SP5 și SP6)
Substanță de control negativă la RT	1 reacție
Substanță de control apă	1 reacție
<b>Cu amestecul de soluții de amorsare și sonde BCR-ABL Mbcr (PPF-Mbcr) (16 reacții)</b>	
4 probe de ADN complementar	4 x 2 reacții
1 substanță de control puternic pozitivă ADN complementar	1 reacție
1 calibrator IS-MMR ADN complementar	1 reacție
Standarde cu o singură plasmidă	1 x 5 reacții (SP1, SP2, SP3, SP5 și SP6)
Substanță de control apă	1 reacție

## Procesarea probelor pe instrumentele LightCycler 1.2, 1.5 și 2.0

Vă recomandăm să testați cel puțin 4 probe de ADN complementar în același experiment pentru a optimiza utilizarea standardelor și a amestecurilor de soluții de amorsare și sonde. Schema capilarelor din Figura 6 prezintă un experiment exemplificativ.



**Figura 6. Configurarea sugerată a rotorului pentru un experiment efectuat cu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit. SP1-SP6:** Standarde BCR-ABL Mbcr și ABL; **HC:** substanță de control puternic pozitivă ADN complementar; **IS-Cal:** calibrator IS-MMR; **RTneg:** substanță de control negativă RT; **S:** probă de ADN complementar; **H<sub>2</sub>O:** substanță de control apă.

## qPCR pe instrumentele LightCycler 1.2, 1.5 și 2.0

**Notă:** Toate etapele vor fi efectuate pe gheață.

### Procedură

1. **Decongețați toate componentele necesare și așezați-le pe gheață.**
2. **Vortexați standardele, PPF-Mbcr și tuburile PPC-ABL și centrifugați pentru scurt timp (aproximativ 10 s, 10.000 rot/min, pentru a colecta lichidul în partea de jos a tubului).**
3. **Preparați următorul amestec qPCR în funcție de numărul de probe procesate.**

Toate concentrațiile se referă la volumul final al reacției.

Tabelul 12 descrie schema de pipetare pentru prepararea unui amestec de reactivi, calculată pentru a obține un volum final de reacție de 20  $\mu$ l. Poate fi preparat un amestec preliminar, în funcție de numărul de reacții, folosind același amestec de soluții de amorsare și sonde (PPC-ABL sau PPF-Mbcr). Sunt incluse volume suplimentare pentru a compensa eroarea de pipetare.

**Tabelul 12. Prepararea amestectului qPCR pentru instrumentele LightCycler 1.2, 1.5 și 2.0**

<b>Componentă</b>	<b>1 reacție (μl)</b>	<b>ABL: 16+1 reacții (μl)</b>	<b>BCR-ABL Mbc: 16+1 reacții (μl)</b>	<b>Concentrație finală</b>
<i>Premix Ex Taq, 2x</i>	10	170	170	1x
Amestec de soluții de amorsare și sonde, 25x	0,8	13,6	13,6	1x
Apă de calitate PCR fără nuclează	4,2	71,4	71,4	–
Probă (de adăugat la pasul 5)	5	Câte 5	Câte 5	–
Volum total	20	Câte 20	Câte 20	–

4. Distribuți 15 μl de amestec qPCR preliminar per capilar.
5. Într-o zonă de laborator diferită și cu echipament dedicat, adăugați 5 μl de produs RT (ADN complementar, 200 ng echivalent ARN) obținut în transcrierea inversă (consultați „Protocol: Transcriere inversă prin utilizarea SuperScript III Reverse Transcriptase”, pagina 13) în capilarul corespunzător (volum total 20 μl).
6. Amestecați ușor, prin pipetare pe verticală.
7. Așezați capilarele în adaptoarele furnizate împreună cu aparatul și centrifugați pentru scurt timp (700 x g, aproximativ 10 s).
8. Încărcați capilarele termociclor, conform recomandărilor producătorului.
9. Programați instrumentul LightCycler 1.2, 1.5 sau 2.0 la programul de termociclare, așa cum este indicat în Tabelul 13.

**Tabelul 13. Profilul de temperatură**

<b>Modul de analiză</b>	Cuantificare
<b>Hold 1 (Reținere 1)</b>	Temperature (Temperatură): 95 °C Time (Timp): 10 s Rampă: 20
<b>Cycling (Repetare ciclu)</b>	50 times (50 de ori) 95 °C timp de 5 s; rampă: 20 60 °C timp de 30 s; rampă: 20; cu achiziția fluorescenței FAM: Unic
<b>Hold 2 (Reținere 2)</b>	Temperature (Temperatură): 36 °C Time (Timp): 1 min Rampă: 20

**10. Pentru LightCycler 1.2 și 1.5, parcurgeți etapa 10a. Pentru LightCycler 2.0, parcurgeți etapa 10b.**

**10a. LightCycler 1.2 și 1.5: Se recomandă F1/F2 și modul „2<sup>nd</sup> derivative analysis” (analiză cu derivată secundară). Porniți programul de termociclare, așa cum este indicat în Tabelul 13.**

**10b. LightCycler 2.0: Vă recomandăm să utilizați analiza automată (F''max) pe LightCycler 2.0 Software versiunea 4.0 pentru a obține rezultate reproductibile. Porniți programul de termociclare, așa cum este indicat în Tabelul 13.**

# Interpretarea rezultatelor

## Principiul analizei datelor

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

Dacă utilizați standarde cu un număr cunoscut de molecule, se poate stabili o curbă standard și se poate determina cantitatea exactă de țintă prezentă în proba de testare. Curbele standard *ipsogen* se bazează pe plasmide. Pentru a asigura curbe standard de precizie, folosim patru diluții standard pentru ABL și 5 diluții standard pentru Mbc. Kitul include, de asemenea, un calibrator IS-MMR care permite conversia rezultatelor la scara internațională. Figurile 7 și 8 prezintă exemple de curbe de amplificare TaqMan obținute pentru standarde, calibratorul IS-MMR și substanță de control ARN puternic pozitivă cu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit.

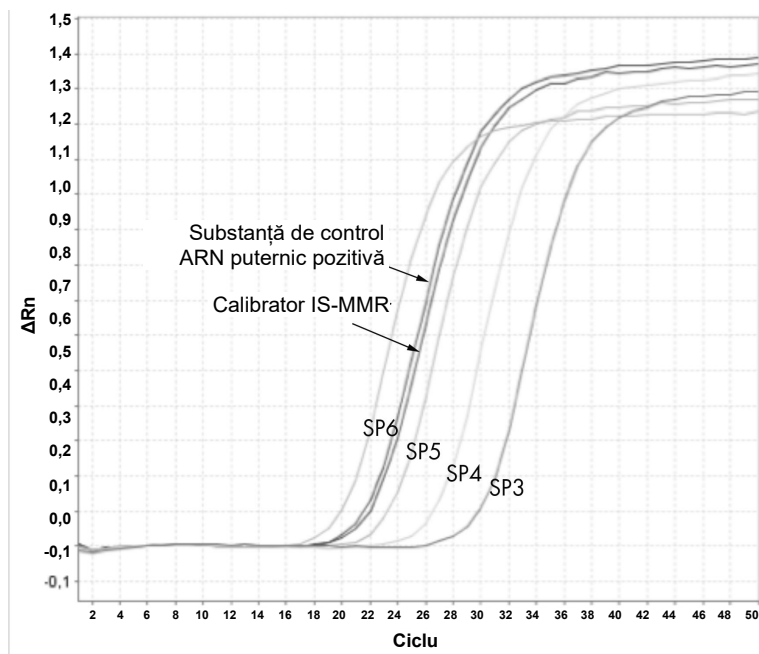
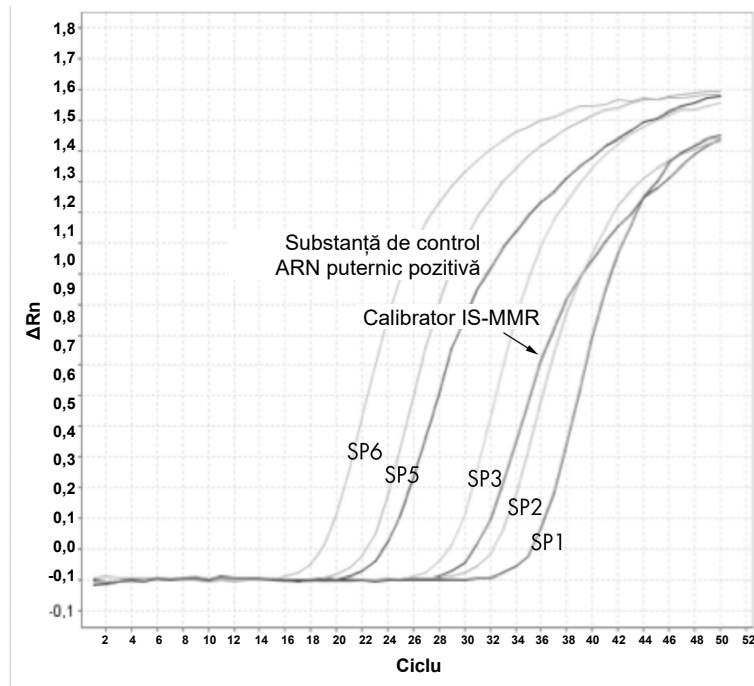


Figura 7. Detecția ABL cu standardele SP3, SP4, SP5 și SP6.  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  și  $10^6$  copii/5  $\mu$ l.



**Figura 8. Detectia BCR-ABL Mbcu cu standardele SP1, SP2, SP3, SP5 și SP6.  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  copii/5  $\mu$ l.**

## Curbe standard și criterii de control al calității aplicabile datelor brute

### Reproductibilitatea între replicate

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

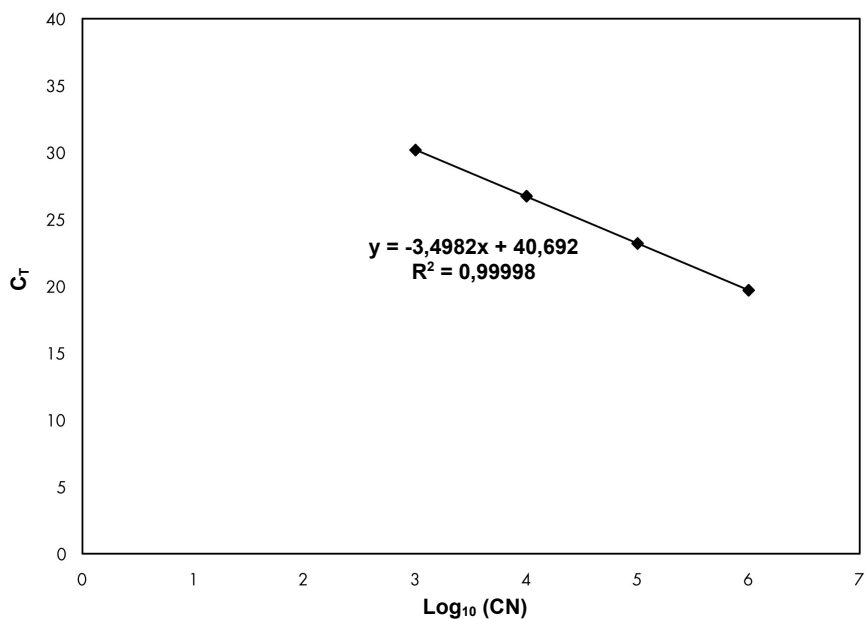
Variația valorilor  $C_T$  între replicate este în general  $<1,5$ , dacă valoarea medie  $C_T$  a replicatelor este  $<36$  (7).

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

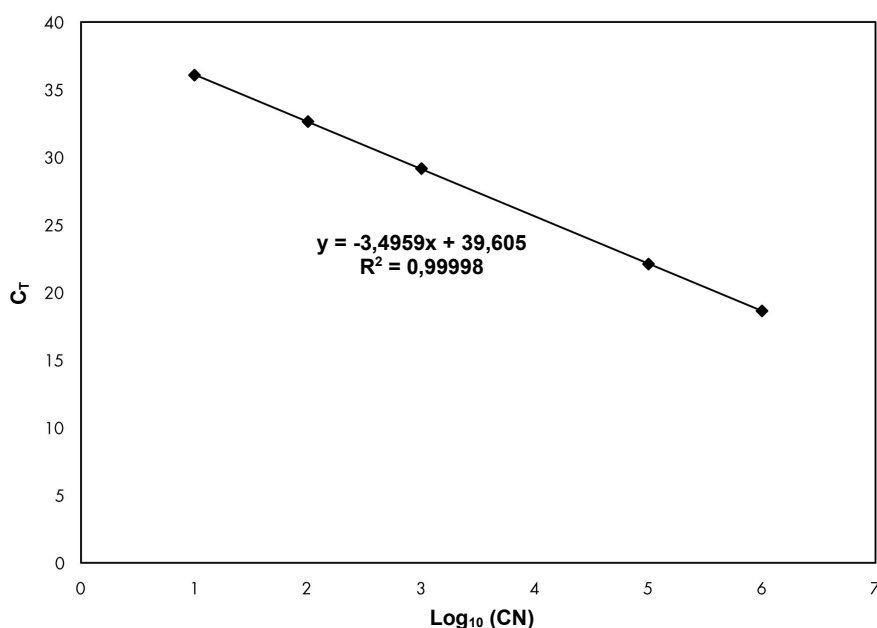
### Curbe standard

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

Pentru fiecare genă (ABL și BCR-ABL), valorile brute  $C_T$  obținute din diluțiile standard de plasmide sunt reprezentate grafic în funcție de numărul de copii logaritmice (3, 4, 5 și 6 pentru SP3, SP4, SP5 și SP6; 1, 2, 3, 5 și 6 pentru SP1, SP2, SP3, SP5 și SP6). Figura 9 prezintă un exemplu de curbă standard ABL teoretică calculată pe patru diluții standard. Figura 10 prezintă un exemplu de curbă standard BCR-ABL teoretică calculată pe cinci diluții standard.



**Figura 9. Curba standard teoretică pentru ABL calculată din 4 diluții standard.** Se calculează o curbă de regresie liniară ( $y = ax + b$ ), unde  $a$  este panta dreptei și  $b$  este intersecția în  $y$ , care este coordonata  $y$  a punctului în care linia intersectează axa  $y$ . Ecuația și coeficientul de determinare ( $R^2$ ) sunt imprimate pe grafic.



**Figura 10. Curba standard teoretică pentru BCR-ABL calculată din 5 diluții standard.** Se calculează o curbă de regresie liniară ( $y = ax + b$ ), unde  $a$  este panta dreptei și  $b$  este intersecția în  $y$ , care este coordonata  $y$  a punctului în care linia intersectează axa  $y$ . Ecuația și coeficientul de determinare ( $R^2$ ) sunt imprimate pe grafic.

Deoarece standardele sunt diluții 10x, panta teoretică a curbei este  $-3,3$ . O pantă între  $-3,0$  și  $-3,9$  este acceptabilă atât timp cât  $R^2$  este  $>0,95$  (7). Cu toate acestea, pentru rezultate de precizie se recomandă o valoare pentru  $R^2 >0,98$  (3).



**Notă:** Diluția standard SP1 (plasmida BCR-ABL, 10 copii) trebuie detectată și inclusă în curba standard BCR-ABL.

### **Controlul calității pe toate valorile ABL**

Calitatea slabă a ARN-ului sau problemele în timpul etapelor qPCR au ca rezultat o valoare scăzută a numărului de copii ABL ( $ABL_{CN}$ ). Sensibilitatea optimă este atinsă cu probe care generează  $ABL_{CN} \geq 10.000$  de copii. Acest criteriu pentru  $ABL_{CN}$  se aplică și substanței de control ARN puternic pozitive și calibratorului IS-MMR.

### **Substanțe de control negative RT și cu apă**

Substanțele de control fără șablon (No Template Control, NTC) pentru etapa PCR (substanță de control apă) și etapa de transcriere inversă (substanță de control negativă RT) nu trebuie să genereze CN zero pentru ABL și pentru BCR-ABL Mbc. Un rezultat pozitiv pentru aceste NTC-uri indică o contaminare încrucișată în timpul transcrierii inverse și/sau qPCR.

### **Numărul de copii normalizat (Normalized Copy Number, NCN)**

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

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

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

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

Calculați rezultatul NCN pentru substanța de control ARN puternic pozitivă ( $NCN_{HC}$ ), calibratorul IS-MMR ( $NCN_{cal}$ ) și pentru fiecare probă ( $NCN_{probă}$ ).

### **Substanță de control ARN puternic pozitivă și calibrator IS-MMR**

Aceste substanțe de control permit monitorizarea etapelor de transcriere inversă și de amplificare ABL și BCR-ABL Mbc în timpul cuantificării transcripției.

## Controlul calității pentru rezultatul $NCN_{cal}$

**Notă:** Rezultatul NCN obținut pentru calibratorul IS-MMR, testat cu *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR Kit în combinație cu reactivi și instrumente validate (consultați „Materiale furnizate”, pagina 9 și „Materiale necesare, dar nefurnizate”, pagina 10) trebuie să se încadreze în intervalul 0,05-0,3. În caz contrar, valorile NCN nu pot fi convertite la scara internațională. În plus, întregul experiment trebuie respins dacă nu este detectat substanța de control ARN puternic pozitivă.

## Conversie IS și raportare MMR

**Notă:** Înainte de interpretare, consultați valoarea indicată pe eticheta tubului calibratorului IS-MMR sau pe buletinul de analiză furnizat împreună cu kitul.

Utilizați rezultatul experimental NCN al calibratorului IS-MMR ( $NCN_{cal}$ ) și valoarea atribuită a acestuia (valoarea IS-Cal) indicată în buletinul de analiză pentru a calcula numărul de copii normalizat la scară internațională ( $IS-NCN_{probă}$ ).

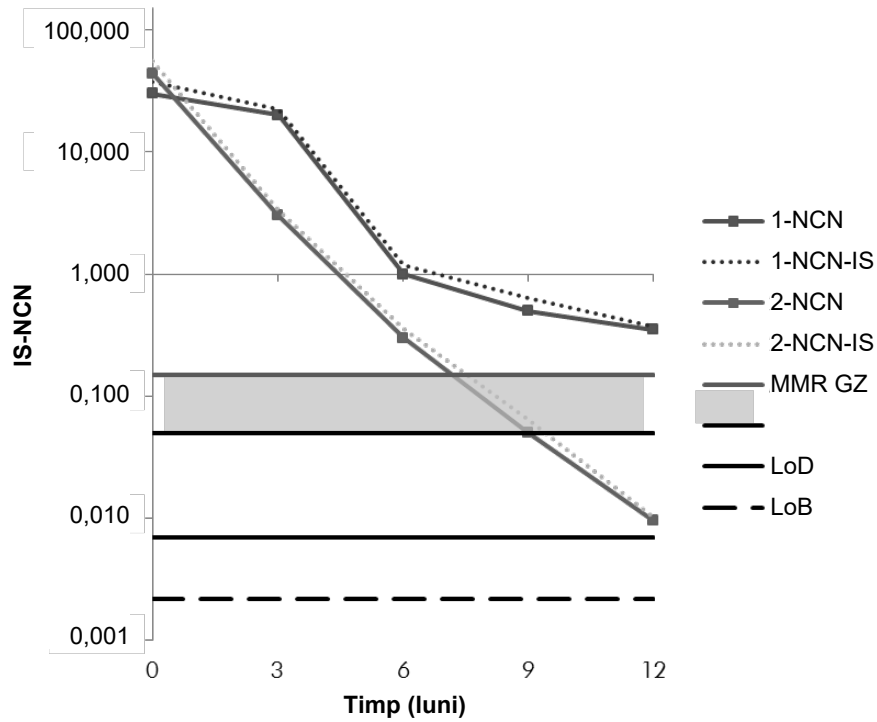
$$IS-NCN_{probă} = \frac{NCN_{probă} \times \text{valoarea IS-Cal}}{NCN_{cal}}$$

Determinați starea MMR a fiecărei probe în conformitate cu următoarele criterii.

- **$IS-NCN_{probă} \leq 0,05$ :** Răspuns molecular major
- **$0,05 < IS-NCN_{probă} < 0,15$ :** Zonă gri în jurul valorii de prag MMR, rezultat neconcludent
- **$IS-NCN_{probă} \geq 0,15$ :** Niciun răspuns molecular major

Rezultatul  $IS-NCN_{HC}$  (NCN la scară internațională pentru substanța de control ARN puternic pozitivă) nu ar trebui să genereze un răspuns molecular major.

Figura 11 prezintă un exemplu de monitorizare a pacientului folosind rezultatele NCN și  $IS-NCN$ .



**Figura 11. Monitorizarea curbelor pentru starea MMR a pacientului cu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit.** NCN: număr de copii normalizat; NCN-IS: număr de copii normalizat la scară internațională; MMR GZ: zonă gri (Gray Zone, GZ) MMR rezultat neconcludent; LoD: limită de detecție; LoB: limită de blank.

## Rezumatul criteriilor de calitate

Tabelul 14 sintetizează diferitele criterii de control al calității și valorile asociate ale rezultatelor.

**Tabelul 14. Rezumat criterii de calitate**

<b>Criterii</b>	<b>Valori/rezultate acceptabile</b>
Variații ale valorilor $C_T$ între replicate	$\leq 2 C_T$ , dacă valoarea medie $C_T > 36$ $\leq 1,5 C_T$ , dacă valoarea medie $C_T \leq 36$
Pantă pentru curbele standard	Între $-3,0$ și $-3,9$
$R^2$ pentru curbele standard	Cel puțin $>0,95$ , se recomandă $>0,98$
Diluție standard SP1 (plasmidă BCR-ABL 10 copii)	Trebuie detectată și inclusă în curba standard
Controlul calității pentru valoarea $ABL_{CN}$ pentru probele de la pacienți, substanța de control ARN puternic pozitivă și calibratorul IS-MMR	$ABL_{CN} > 10.000$ copii de ABL pentru a atinge sensibilitatea optimă
Substanțe de control PCR (apă) și transcriere inversă (negative RT).	Pentru $ABL_{CN} = 0$ și $M_{bcr_{CN}} = 0$
NCN obținut pentru calibratorul IS-MMR ( $NCN_{cal}$ )	Trebuie să se încadreze în intervalul $0,05-0,3$
Substanță de control ARN puternic pozitivă	Trebuie să fie detectată
NCN obținut pentru substanța de control ARN puternic pozitivă convertit la scară internațională ( $IS-NCN_{HC}$ )	Stare: Niciun răspuns molecular major

## Depanarea

Pentru informații suplimentare, consultați pagina Întrebări frecvente din cadrul Centrului nostru pentru Asistență Tehnică: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Cercetătorii din cadrul Serviciilor tehnice QIAGEN vă stau întotdeauna la dispoziție pentru a răspunde la orice întrebări pe care le aveți despre informațiile și protocolul din acest manual, precum și despre tehnologiile de prelevare și testare (pentru datele de contact, consultați „Date de contact”, pagina 42).

## Controlul calității

În conformitate cu sistemul de management al calității certificat ISO al QIAGEN, fiecare lot de *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit este testat pentru specificațiile prestabilite, pentru a asigura calitatea consecventă a produsului. Buletinele de analiză sunt disponibile la cerere, la adresa [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Limitări

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

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

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

**Notă:** Kitul a fost conceput conform studiilor „Europe Against Cancer” (EAC) (8, 9) și este în conformitate cu recomandările internaționale actualizate. Kitul conține un calibrator IS-MMR, standardizat la scară internațională, permițând convertirea rezultatelor NCN la scară internațională și raportarea stării răspuns molecular major (Major Molecular Response, MMR).

Fiecare lot de calibrator IS-MMR are o valoare atribuită derivată direct dintr-o calibrare raportată la materialul de referință primar certificat OMS NIBSC (International Genetic Reference Panel for the quantitation of BCR-ABL translocation by RQ-PCR (1st I.S.), ref. 09/138).

Un buletin de analiză care indică valoarea atribuită a calibratorului IS-MMR este furnizat împreună cu fiecare kit.

Kitul trebuie utilizat cu respectarea instrucțiunilor din acest manual, în combinație cu reactivi și instrumente validate (consultați „Materiale necesare, dar nefurnizate”, pagina 10). Orice utilizare care nu este conformă cu eticheta acestui produs și/sau modificarea componentelor vor anula răspunderea QIAGEN.

## Caracteristici de performanță

**Notă:** Caracteristicile de performanță au fost stabilite folosind Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System împreună cu *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR Kit și reactivi suplimentari validați (consultați „Materiale necesare, dar nefurnizate”, pagina 10).

## Limita de blanc și limita de detecție

Limita de blanc (Limit of Blank, LoB) și limita de detecție (limit of detection, LoD) au fost determinate conform ghidului CLSI/NCCLS EP17-A.

Limita de blanc (Limit of Blank, LoB) a fost determinată pe probe negative de la donatori sănătoși (11 probe, 69 de măsurători) și s-a dovedit a fi egală cu 0,0022 BCR-ABL Mbcn NCN.

Limita de detecție (Limit of Detection, LoD sau sensibilitatea analitică) a fost determinată pe probe slab pozitive cunoscute ( $n = 8$ , 74 măsurători) și s-a dovedit a fi egală cu 0,0069 BCR-ABL Mbcn NCN.

- **NCN ≤ LoB:** BCR-ABL Mbcn nedetectat
- **LoB < NCN < LoD:** BCR-ABL Mbcn detectat, dar necuantificat
- **NCN ≥ LoD:** BCR-ABL Mbcn cuantificat

## Liniaritate

Liniaritatea a fost determinată în conformitate cu Ghidul CLSI/NCCLS EP6-A.

Studiul a fost realizat pe amestecuri de ARN pozitiv și negativ extras din linii celulare. Unsprezece niveluri diferite au fost testate în triplicate. Rezultatele obținute pe aceste probe arată că testul *ipsogen* BCR-ABL Mbcn IS-MMR este liniar într-un interval de la 0,003 la 65 BCR-ABL Mbcn NCN.

## Date de intrare

Cinci ARN-uri diferite cu diferite niveluri NCN BCR-ABL Mbcn au fost selectate pentru studiu. Au fost testate cantități diferite de ARN și ADN complementar pentru a evalua impactul de intrare asupra rezultatelor NCN. Rezultatele au arătat că variația de intrare a ARN-ului a avut un impact limitat asupra rezultatelor NCN; în timp ce intrarea ADN-ului complementar a fost un factor mai sensibil, dacă se folosește mai mult sau mai puțin material. În consecință, pentru efectuarea testului se recomandă o intrare de 1 μg de ARN și 5 μl de ADN complementar.

## Precizie

Precizia a fost determinată în conformitate cu Ghidul CLSI/NCCLS EP5-A2.

Studiul preciziei a fost efectuat pe 13 probe diferite testate de 42 de ori în duplicat ( $n = 84$ ). Aceste probe au fost reprezentative pentru nivelul diferit de expresie BCR-ABL Mbcn în probele de la pacienți în jurul și peste valoarea MMR. S-a constatat un coeficient global de variație în jurul valorii MMR egal cu 25 %.

## Studiul concordanței: ERM-AD623 BCR-ABL1 cu o singură plasmidă (IRMM) comparativ cu standardele *ipsogen* cu o singură plasmidă (QIAGEN)

Cele mai recente definiții de lucru ale răspunsului molecular BCR-ABL1 MbcR în LMC sunt oferite de Grupul de coordonare pentru monitorizare moleculară ELN/EUTOS, care recomandă utilizarea plasmidei ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM, Belgia): Cross, N.C., et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia (2015) *Leukemia*. **29**, 999.

Pentru a se conforma acestei recomandări, QIAGEN a efectuat un studiu de concordanță pentru a compara plasmida unică multi-țintă *ipsogen*, utilizată în *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit (24) CE (nr. cat. 670723) cu plasmida ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM).

Comparația s-a bazat pe raportul numerelor de copii normalizate (Normalized Copy Number, NCN) BCR-ABL1 MbcR/ABL1, evaluat folosind oricare dintre cele două diluții standard (*ipsogen* sau ERM-AD623 BCR-ABL1), pe probe de control incluse în kiturile *ipsogen* și pe material de referință certificat de la NIBSC; White, H.E., et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.

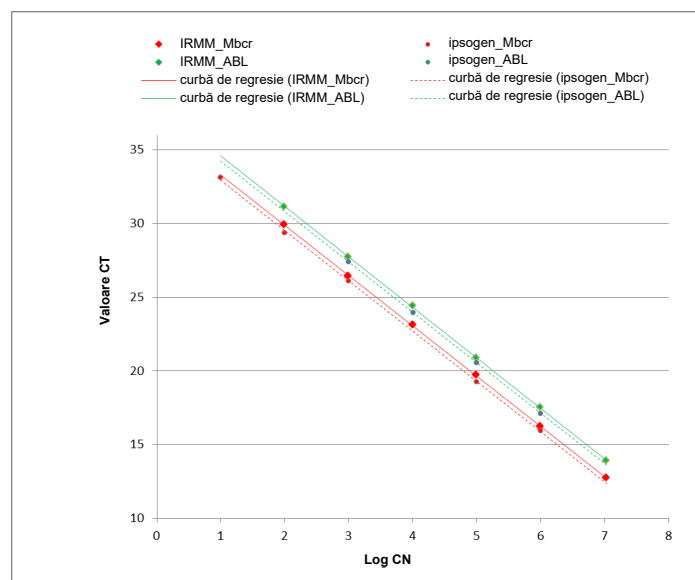
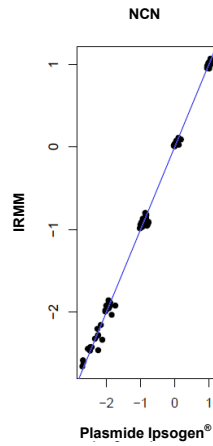


Figura 12. Curbele standard ale plasmidelor *ipsogen* și ERM-AD623 BCR-ABL1 sunt alinierte.



*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit.

**Figura 13. ERM-AD623 BCR-ABL1 comparativ cu valorile *ipsogen* NCN.**

Studiul QIAGEN concluzionează că nu există nicio diferență statistică: Standardele plasmidei unice ERM-AD623 BCR-ABL1 și ale plasmidei unice *ipsogen* generează rezultate echivalente.



## Referințe

1. 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.
2. Baccarani, M. et al. (2009) Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6041.
3. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.
4. Branford, S. 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.
5. Hughes, T. et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* **108**, 28.
6. White, H.E. et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.
7. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and van Dongen, J.J. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
8. 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.
9. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.

## Simboluri

Pe ambalaj și pe etichete pot apărea următoarele simboluri:



Conține reactivi suficienți pentru <N> reacții



Data de expirare



Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro



Număr catalog



Număr de lot



Număr material



Număr de comercializare global articol



Limitări de temperatură



Producător



Consultați instrucțiunile de utilizare

## Date de contact

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

## Informații pentru comandă

Produs	Cuprins	Nr. cat.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit (24)	Pentru 24 de reacții: Standarde pentru plasmidă unică MbcR și ABL, substanță de control ARN puternic pozitivă, calibrator IS-MMR, amestec de soluții de amorsare și sonde ABL, amestec de soluții de amorsare și sonde genă de fuziune BCR-ABL MbcR	670723
<b>Rotor-Gene Q MDx – pentru analiza real-time PCR validată de IVD în aplicații clinice</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclator pentru real-time PCR și analizor de topire la înaltă rezoluție cu 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins) plus canal HRM, laptop, software, accesorii: garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalarea și instruirea nu sunt incluse	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclator pentru real-time PCR și analizor de topire la înaltă rezoluție cu 5 canale (verde, galben, portocaliu, roșu, roșu aprins) plus canal HRM, laptop, software, accesorii: garanție de 1 an pentru componente și manoperă, instalare și instruire	9002033
<b><i>ipsogen</i> RT Kit — pentru transcriere inversă</b>		
<i>ipsogen</i> RT Kit	Revers-transcriptază, soluție de amorsare aleatorie, DTT, dNTP, inhibitor de RNază, RT Buffer	679923
<b>RNeasy Midi Kit – pentru purificarea ARN-ului total</b>		
RNeasy Midi Kit (50)	Pentru 50 de preparări ale ARN-ului: 50 RNeasy Midi Spin Columns, tuburi de recoltare (15 ml), reactivi și soluții tampon fără RNază	75144

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

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

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

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

Mărci comerciale: QIAGEN®, Sample to Insight®, *ipsogen*®, RNeasy®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, RNaseOUT™, ROX™, SuperScript®, SYBR®, TAMRA™, TRIzol® (Thermo Fisher Scientific Inc.); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Excel® (Microsoft Corporation); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); *Premix Ex Taq*™ (Takara Bio, Inc.).

#### Acord de licență limitată

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

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

Pentru termenii actualizați ai licenței, consultați [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1362-003 © 2013-2016 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

---

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

