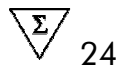


Juli 2016

Handbok för *ipsogen*[®] BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX-kit



Version 1



Kvantitativ in vitro-diagnostik

För användning med Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®], ABI PRISM[®] och LightCycler[®]-instrument



REF 670823



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden, Tyskland

R3 **MAT** 1072511SV



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN är den ledande tillverkaren av innovativa provtagnings- och analystekniker som möjliggör isolering och detektion av innehållet i alla biologiska prover. Våra avancerade produkter och tjänster av hög kvalitet garanterar framgång från prov till resultat.

QIAGEN bestämmer normerna vid:

- rening av DNA, RNA och proteiner
- nukleinsyra- och proteinanalyser
- mikroRNA-forskning och RNAi
- automatisering av provtagnings- och analystekniker

Vårt uppdrag är att göra det möjligt för dig att uppnå utomordentliga framgångar och genombrott. Det finns mer information på [**www.qiagen.com**](http://www.qiagen.com).

Innehåll

Användningsområde	5
Sammanfattning och förklaring	5
Bakgrund för KML	5
Sjukdomsövervakning	5
Testprincip	7
Material som medföljer	9
Satsinnehåll	9
Material som behövs men inte medföljer	11
Varningar och försiktighet	11
Allmänna försiktighetsåtgärder	12
Förvaring och hantering av reagens	13
Hantering och förvaring av prover	13
Procedur	14
Beredning av prov-RNA	14
Protokoller	
■ Omvänd transkription	Fehler! Textmarke nicht definiert.
■ qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- eller Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument med 72-rörsrotor	Fehler! Textmarke nicht definiert.
■ qPCR på Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS och LightCycler 480-instrument	Fehler! Textmarke nicht definiert.
■ qPCR på LightCycler 1.2-, 1.5- och 2.0-instrument	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Tolkning av resultat	31
Dataanalysprincip	31
Standardkurvor och kvalitetskriterier som är tillämpliga på rådata	32
Normaliserat kopieantal (normalized copy number, NCN)	34
IS-konvertering och MMR-rapportering	35
Sammanfattning av kvalitetskriterier	36
Felsökning	37
Kvalitetskontroll	38
Begränsningar	38
Prestandaegenskaper	38

Gräns för blankprov och gräns för detektion	39
Linjäritet	39
Inmatningar	39
Precision	39
Studie av överensstämmelse: ERM-AD623 BCR-ABL1 -enkelpasmidstandard (IRMM) jämfört med ipsogen-enkelpasmidstandard (QIAGEN)	40
Litteraturhänvisningar	42
Symboler	43
Kontaktinformation	43
Beställningsinformation	44

Användningsområde

ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR-kitet är avsett för kvantifieringen av BCR-ABL p210 b2a2- eller b3a2-transkript i benmärg eller i prov på perifert blod från patienter med akut lymfoblastisk leukemi (ALL) eller kronisk myeloisk leukemi (KML) som tidigare fått diagnos på bildande av fusionsgenen (FG) BCR-ABL MbcR. Testet är avsett för att utvärdera nivån av molekyllärt svar; resultat kan användas för uppföljning av minimal restsjukdom.

Sammanfattning och förklaring

Bakgrund för KML

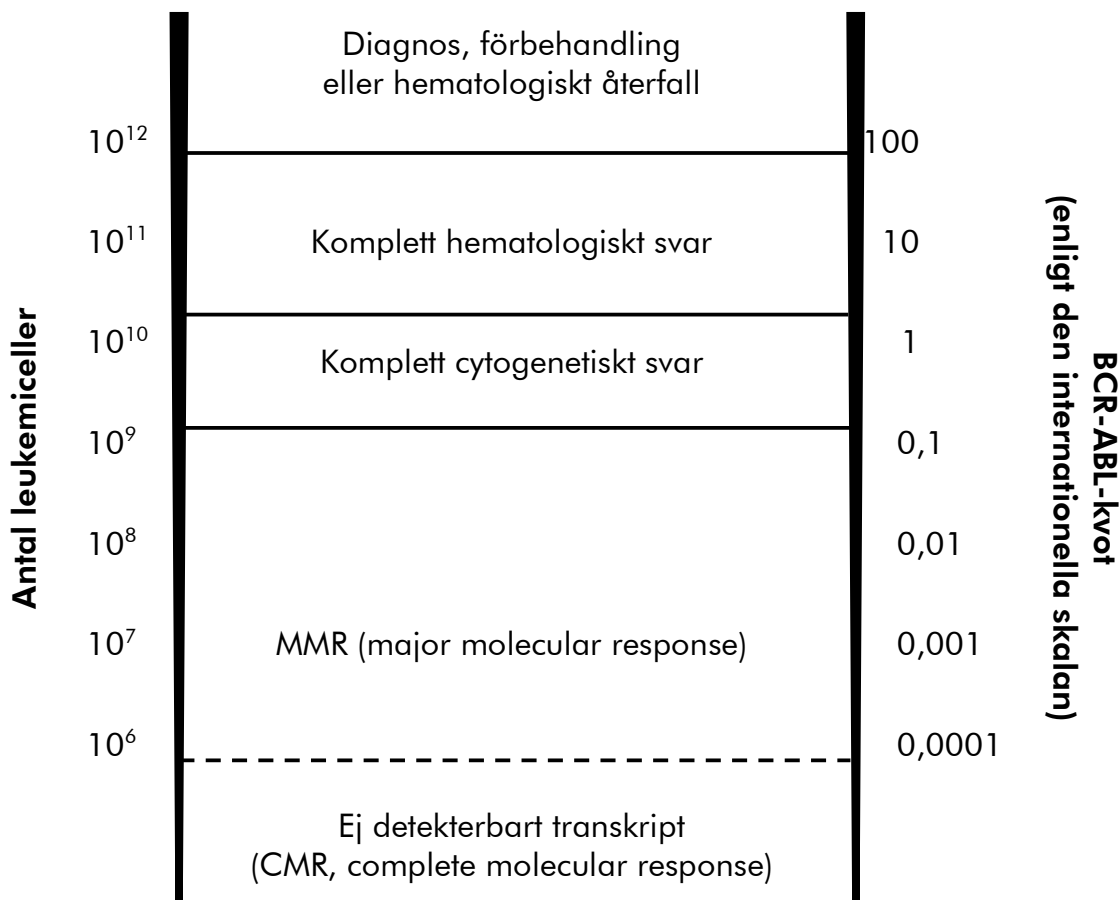
KML tillhör gruppen myeloproliferativa neoplasmer och kännetecknas i > 90% av fallen av förekomsten av Philadelphia-kromosomen (Ph CHR5).

Denna kromosom är produkten av en reciprok translokation mellan de långa armarna i kromosom 9 och 22, t(9;22), med BCR ("breakpoint cluster region") belägen på kromosom 22 och c-ABL-onkogenen härrörande från kromosom 9. Den motsvarande fusionsgenen, BCR-ABL, transkriberas till ett 8,5 kb mRNA med 2 föreningspunktsvarianter, b2a2 (i 40% av fallen) och b3a2 (i 55% av fallen). Det kodar ett chimärt protein, p210, med förhöjd tyrosinkinasaktivitet. Transkripten b2a3 and b3a3 utgör mindre än 5 % av fallen. En Ph-kromosom kan också detekteras hos 35% av vuxna ALL-patienter.

Den årliga incidensen av KML är cirka 1–2 per 100.000, och KML står för 20% av leukemierna hos vuxna. Den kännetecknas kliniskt av ett överskott på myeloiska celler som differentieras och fungerar normalt. KML-patienter diagnostiseras i 90–95% av fallen i den kroniska eller stabila fasen av sjukdomen. Historiskt sett gick patienterna, efter i genomsnitt 4 till 6 år, in i en accelererad fas som ledde till blastkris och akut leukemi, vilket alltid leder till döden. Tillkomsten av imatinib, och på senare tid andra generationens tyrosinkinashämmare (TKI), förändrade dramatiskt sjukdomens naturliga förlopp: de flesta av patienterna är nu i remission och behöver långvarig uppföljning och sjukdomsövervakning.

Sjukdomsövervakning

Hittills har målet för KML-terapi varit att uppnå 100% överlevnad och Ph-kromosomnegativitet. Därför är sjukdomsövervakning ett väsentligt verktyg för att bedöma behandlingssvaret och detektera tidiga återfall för varje enskild patient. Under TKI-terapi brukar patienterna progrediera från hematologisk till cytogenetisk och sedan molekyllär remission, vilket motsvarar ett minskande antal leukemiceller och BCR-ABL-transkript så som beskrivs närmare i figur 1 nedan.



Figur 1. Hämtad från litteraturhänvisning 1.

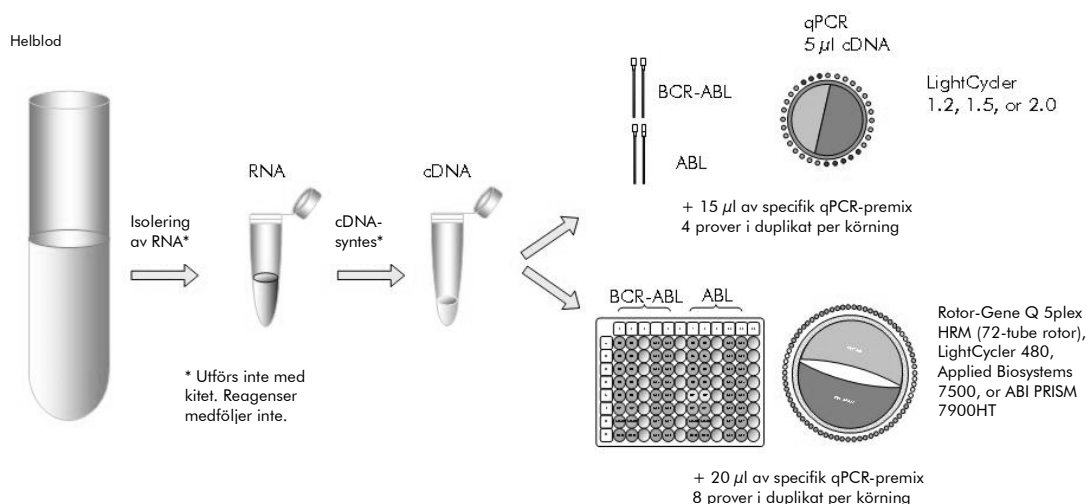
Standardmetoden för att beräkna tumörbördan hos KML-patienter är konventionell cytogenetisk analys (G-banding) på metafaser i benmärg (BM). Cytogenetiskt svar bedöms på minst 20 benmärgsmetafaser. Nivån av cytogenetiskt svar beräknas på procentandelen Ph-kromosompositiva metafaser (se tabell 1, litteraturhänvisning 2). Denna bedömning är dock beroende av laboratoriets prestanda och har en låg känslighet på 5% när 20 metafaser analyseras.

Realtids kvantitativ polymeraskedjereaktion (qPCR) som kvantifierar BCR-ABL M_{bcr}-mRNA på prover av perifert blod (PB) ingår numera i metoderna för sjukdomsövervakning av KML som behandlas. Metoden är mindre invasiv än konventionell cytogenetik för benmärgsmetafaser och dessutom känsligare.

Rekommendationerna för KML-sjukdomsövervakning har även uppdaterats nyligen så att de innefattar nya kliniska evidens från kliniska prövningar samt förbättrade mål och verktyg för sjukdomsövervakning. De senaste rekommendationerna för svarsdefinition och övervakning av patienter på imatinib kommer från ELN-experterna (2).

Ur en teknisk ståndpunkt har insatser gjorts av internationella experter för att harmonisera testning och rapportering av BCR-ABL Mbc (3–5). Dessutom har en referenspanel validerats nyligen under beskydd av WHO, i syfte att möjliggöra en enkel standardisering av BCR-ABL-kvantifiering (6).

Testprincip



Figur 2. RNA-isolering, cDNA-syntes och qPCR.

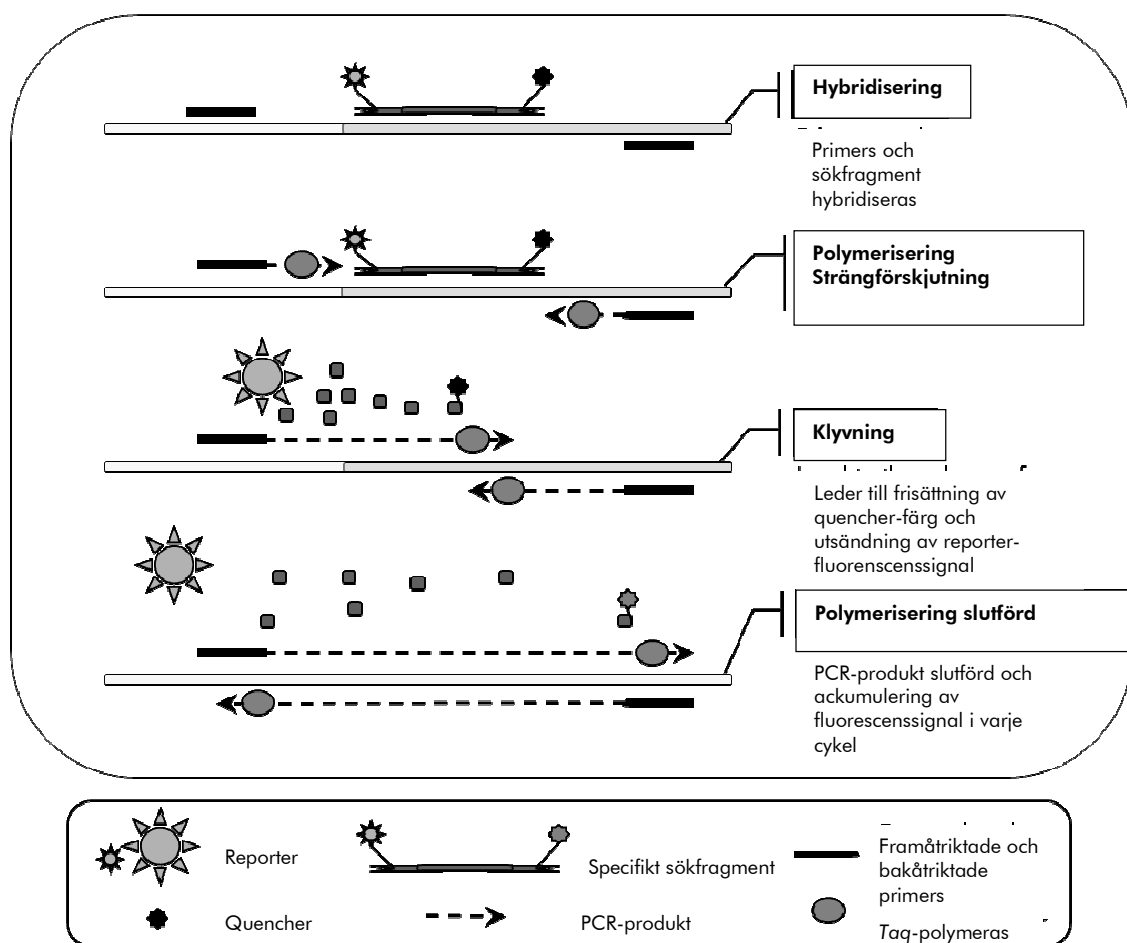
Med qPCR går det att göra en noggrann kvantifiering av PCR-produkter under den exponentiella fasen i PCR-amplifieringsprocessen. Kvantitativa PCR-data kan erhållas snabbt, utan någon behandling efter PCR, genom realtidsdetektion av fluorescenssignaler under och/eller direkt efter PCR-cykling, vilket drastiskt minskar risken för att PCR-produkter ska kontamineras. För närvarande finns det 3 huvudtyper av qPCR-tekniker att välja på: qPCR-analys med SYBR[®] Green I-färg, qPCR-analys med hydrolyssökfragment och qPCR-analys med hybridiseringsökfragment.

I denna analys utnyttjas principen för qPCR-dubbelfärgad oligonukleotidhydrolysis. Under PCR hybridiseras framåtriktade och bakåtriktade primers till en specifik sekvens. En dubbelfärgad oligonukleotid ingår i samma blandning. Detta sökfragment, vilket består av en oligonukleotid märkt med en 5'-reporter-färg och en nedströms 3'-quencher-färg, hybridiseras till en målsekvens inom PCR-produkten. Vid qPCR-analys med hydrolyssökfragment utnyttjas 5'→3'-exonukleasaktiviteten hos DNA-polymeraset för *Thermus aquaticus* (*Taq*). När sökfragmentet är intakt, leder närheten mellan reporter-färgen och quencher-färgen till suppression av reporter-fluorescensen, primärt genom energiöverföring av Förster-typ.

Under PCR, om det intressanta målet förekommer, hybridiseras sökfragmentet specifikt mellan ställena för den framåtriktade och bakåtriktade primern. DNA-polymerasets 5'→3'-exonukleasaktivitet gör att sökfragmentet klyvs mellan

reporter och quencher, men endast om sökfragmentet hybridiseras till målet. Sökfragmenten förskjuts sedan från målet, och polymeriseringen av strängen fortsätter. Sökfragmentets 3'-ände är blockerad för att förhindra att sökfragmentet förläses under PCR (figur 3). Denna process sker i varje cykel och stör inte den exponentiella ackumuleringen av produkt.

Ökningen av fluorescenssignal detekteras endast om målsekvensen är komplementär till sökfragmentet och alltså amplifieras under PCR. På grund av dessa krav sker ingen detektering av icke-specifik amplifiering. Ökningen av fluorescens är alltså direkt proportionell till målamplicifieringen under PCR.



Figur 3. Reaktionsprincip. Totalt RNA transkriberas omvänt, och det framställda cDNA:t amplifieras med PCR med hjälp av ett par specifika primers och ett specifikt internt dubbelfärg-sökfragment (FAM™-TAMRA™). Sökfragmentet binds till ampliconet under varje hybridiseringssteg för PCR. När Taq förlängs från primern som är bunden till ampliconet, förskjuter den 5'-ändan av sökfragmentet, vilket sedan bryts ned av 5'→3'-exonukleasaktiviteten hos Taq-DNA-polymeraset. Klyvning fortsätter tills det återstående sökfragmentet smälter bort från ampliconet. Denna process frisätter fluoroforen och quenchern i lösning, vilket skiljer dem åt spatialt och leder till en ökad fluorescens från FAM och en minskad fluorescens från TAMRA.

Material som medföljer

Satsinnehåll

<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit		(24)
Katalognr		670823
Antal reaktioner		24
Omvänd transkription		
Omvänt transkriptas		36 µl
5x RT-buffert för omvänd transkription		180 µl
dNTP Mix*		72 µl
Random (slumpmässig) primer [†]		190 µl
RNas-hämmare		18 µl
DTT [‡]		45 µl
Kalibrering		
High Positive RNA Control (hög positiv RNA-kontroll)		10 µl x 3
IS-MMR Calibrator (IS-MMR-kalibrator)		10 µl x 3
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Standardlösning för MbcR och ABL enkelplasmid) (10 ¹ kopior/5 µl)	SP1-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Standardlösning för MbcR olplasmid) (10 ² kopior/5 µl)	SP2-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR och ABL enkelplasmid standardlösning (10 ³ kopior/5 µl)	SP3-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl
MbcR och ABL enkelplasmid standardlösning (10 ⁴ kopior/5 µl)	SP4-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR och ABL enkelplasmid standardlösning (10 ⁵ kopior/5 µl)	SP5-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl
MbcR och ABL enkelplasmid standardlösning (10 ⁶ kopior/5 µl)	SP6-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl

* Deoxynukleotider 10 mM var.

† Random (slumpmässig) nonamer oligonukleotid.

‡ Ditiotritol.

Satsinnehåll fortsättning

Reagenser för qPCR		
Master Mix för qPCR	qPCR Mix 2x	2 x 1275 µl
Primers och problandning ABL [§]	PPC-ABL 25x	110 µl
Primers och problandning BCR-ABL Mbc fusionsgen [¶]	PPF-Mbc 25x	110 µl
ROX™ I fluorescensfärg för ABI PRISM-instrument	ROXI	102 µl
ROX II fluorescensfärg för Applied Biosystems- instrument	ROXII	102 µl
Nukleasfritt vatten av PCR-grad		1400 µl
Handbok för ipsogen <i>BCR-ABL1 Mbc IS-MMR-kit</i> (engelska)		1

[§] Blandning av specifika bakåt- och framåtriktade primers för ABL-kontrollgenen plus ett specifikt FAM–TAMRA-sökfragment.

[¶] Blandning av specifika bakåt- och framåtriktade primers för BCR-ABL Mbc-fusionsgenen plus ett specifikt FAM–TAMRA-sökfragment.

Obs! Blanda standarder (SP1–SP6), primers och sökfragmentblandningar försiktigt och centrifugera det omvända transkriptaset Master Mix-tuberna kortvarigt före användning.

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Om du vill ha mer information hänvisas till tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS) som kan erhållas från produktleverantören.

Reagenser

- Reagenser för RNA-rening: De validerade reagenserna är RNeasy Midi Kit, QIAGEN, kat. nr 75144; eller TRIzol® Reagent, Thermo Fisher Scientific, kat. nr 15596-018 eller 15596-026
- Nukleasfritt vatten av PCR-grad

Förbrukningsartiklar

- Nukleasfria, aerosolresistenta, sterila PCR-pipettspetsar med hydrofoba filter
- 0,5 ml eller 0,2 ml RNase- och DNase-fria PCR-rör
- Is

Utrustning

- Mikroliterpipetter* avsedda för PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Bänkcentrifug* med rotor för 0,2 ml/0,5 ml reaktionsrör (som kan uppnå 10.000 varv/minut)
- Realtids-PCR-instrument:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM eller annat RotorGene-instrument; LightCycler 1.2, 1.5, 2.0 eller 480; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; ABI PRISM 7900HT SDS; och tillhörande specifikt material
- Termocykel* eller vattenbad* (för steget med omvänd transkription)

Varningar och försiktighet

För in vitro-diagnostisk användning

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Se lämpligt säkerhetsdatablad (SDS) för mer information. Dessa är tillgängliga online i praktiskt och kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety där du kan hitta, granska och skriva ut datablad för alla satser och satskomponenter från QIAGEN.

Kassera prov- och analysavfall enligt lokala säkerhetsregler.

* Säkerställ att instrumenten kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens rekommendationer.

Följande risk- och försiktighetsuttalanden gäller komponenter i *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX-kit:

DTT 0,1M RT

Varning! Orsaka mild hudirritation. Vid hudirritation: Uppsök läkare för rådgivning/behandling.

Allmänna försiktighetsåtgärder

Vid qPCR-tester krävs god laboratoriesed, inklusive utrustningsunderhåll, som är särskilt inriktad på molekylärbiologi och följer gällande regler och relevanta standarder.

Detta kit är avsett för in vitro-diagnostisk användning. Reagenser och instruktioner som medföljer detta kit har validerats för optimal prestanda. Ytterligare spädning av reagenserna eller förändring av inkuberingstider och -temperaturer kan leda till felaktiga eller oförenliga data. PPC- och PPF-reagenser kan förändras om de utsätts för ljus. Alla reagenser är formulerade specifikt för användning med detta test. För att få en optimal testprestanda får inget ersättningsmaterial användas.

För bestämning av transkriptnivåer med qPCR krävs både den omvända transkriptionen av mRNA:t och amplifieringen av det framställda cDNA:t med PCR. Därför måste hela analysproceduren utföras under RNas-/DNas-fria förhållanden.

Var mycket försiktig för att förhindra:

- RNas-/DNas-kontaminering, vilket kan bryta ned templat-mRNA:t och det framställda cDNA:t
- mRNA- eller PCR-överföringskontaminering som leder till falsk positiv signal

Därför rekommenderar vi följande:

- Använd nukleasfria laboratorieartiklar (t.ex. pipetter, pipettspetsar, reaktionsflaskor) och använd handskar när du utför analysen.
- Använd färska aerosolresistenta pipettspetsar vid alla pipetteringssteg för att undvika korskontaminering av prover och reagenser.
- Bered pre-PCR-masterblandningen med särskilt material (pipetter, spetsar osv.) i ett särskilt område där inga DNA-matriser (cDNA, DNA, plasmid) förs in. Tillsätt templat i en separat zon (helst i ett separat rum) med specifikt material (pipetter, spetsar osv.).
- Hantera standarderna (SP1–SP6) i ett separat rum.

Förvaring och hantering av reagens

Kiten skickas på kolsyreis och måste förvaras vid -15 °C till -30 °C efter leverans.

- Minimera primers och sökfragmentblandningars exponering för ljus (PPC- och PPF-rör).
- Blanda och centrifugera rören försiktigt innan de öppnas.
- Förvara alla kitkomponenter i originalbehållarna.

Dessa förvaringsvillkor gäller både öppnade och oöppnade komponenter. Komponenter som förvaras under andra villkor än de som anges på etiketterna fungerar eventuellt inte på rätt sätt och detta kan påverka analysresultatet negativt.

Utgångsdatum för varje reagens anges på de enskilda komponentetiketterna. Under korrekta förvaringsvillkor behåller produkten sin prestanda fram till utgångsdatumet som står tryckt på etiketten.

Det finns inga uppenbara tecken som visar att denna produkt är instabil. Positiva och negativa kontroller ska dock köras samtidigt med okända patientprover.

Hantering och förvaring av prover

Prover av helblod ska antikoaguleras med kalium-EDTA och förvaras vid $2\text{--}8\text{ °C}$ i högst 5 dagar före RNA-extrahering.

Procedur

Beredning av prov-RNA

RNA-beredning från patientprover (blod eller benmärg) måste ha utförts med en validerad procedur. Analysens kvalitet beror till stor del på kvaliteten hos det inmatade RNA:t. Därför rekommenderar vi att det renade RNA:t kvalificeras med agaros*-gel-elektrofores, med användning av en Agilent® Bioanalyzer® eller spektrofotometri före analys.†

Protokoll: Omvänd transkription

Saker som ska utföras före start

- Bered dNTP:er, 10 mM i varje. Förvaras vid -20 °C i alikvoter.

Procedur

1. **Tina alla nödvändiga komponenter och placera dem på is.**
2. **Blanda väl (vortexblanda inte) och centrifugera kortvarigt (cirka 10 s, 10.000 varv/minut, för att samla upp vätskan i botten på röret). Förvara sedan på is.**
3. **Justera RNA-prover till 0,1 µg/µl. Pipettera 10 µl (1 µg) av varje RNA-prov i separata, märkta rör. Pipettera 10 µl av den höggradigt positiva kontrollen, 10 µl av IS-MMR-kalibratoren och 10 µl nukleasfritt vatten (som RT-negativ kontroll) i separata, märkta rör, och behandla dem parallellt med RNA-proverna, så som beskrivs nedan.**
4. **Inkubera varje prov, kontroll och kalibrator (10 µl vardera) i 5 min vid 65 °C och kyl dem sedan omedelbart på is i 5 min.**
5. **Centrifugera kortvarigt (cirka 10 s, 10.000 varv/minut, för att samla upp vätskan i botten på röret). Förvara sedan på is.**
6. **Bered nedanstående RT-blandning enligt antalet prover, kontroller och kalibratorer som ska behandlas (tabell 1).**

* Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier.

† Optisk densitet uppmätt vid 260 och 280 nm: OD på 1,0 vid 260 nm är ekvivalent med cirka 40 µg/ml enkelsträngat RNA. En A_{260}/A_{280} -kvot mellan 1,8 och 2,1 tyder på höggradigt renat RNA.

Tabell 1. Beredning av RT-blandning

Komponent	Volym per prov (μl)	Slutlig koncentration
RT-buffert 5x (medföljer omvänt transkriptas)	5,0	1x
dNTP:er (10 mM i varje, ska beredas i förväg och förvaras vid $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i alikvoter)	2,0	0,8 mM
Random (slumpmässig) nonamer (100 μM)	5,25	21 μM
RNas-hämmare (40 E/ μl)	0,5	0,8 E/ μl
Omvänt transkriptas (200 E/ μl)	1,0	8 E/ μl
DTT (medföljer omvänt transkriptas)	1,25	–
Uppvämt RNA-prov, kontroll eller IS-MMR-kalibrator (tillsätts i steg 7)	10,0	40 ng/ μl
Slutlig volym	25,0	–

- 7. Pipettera 15 μl RT-blandning i varje PCR-rör. Tillsätt sedan 10 μl (1 μg) prov-RNA, kontroll eller kalibrator (från steg 4).**
- 8. Blanda väl (vortexblanda inte) och centrifugera kortvarigt (cirka 10 s, 10.000 varv/minut, för att samla upp vätskan i botten på röret).**
- 9. Programmera termocykeln med programmet för omvänt transkriptas så som anges i tabell 2.**

Tabell 2. Temperaturprofil

Omvänd transkription 1	Temperatur: 25 °C Tid: 10 min
Omvänd transkription 2	Temperatur: 50 °C Tid: 60 min
Inaktivering	Temperatur: 85 °C Tid: 5 min
Avkylning	Temperatur: 4 °C Tid: 5 min

10. Placera rören i termocykeln och starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 2.

11. När programmet är avslutat ska rören centrifugeras kortvarigt (cirka 10 s, 10.000 varv/minut, för att samla upp vätskan i botten på röret). Förvara rören på is eller vid -20 °C tills qPCR ska utföras, enligt nedanstående protokoll, enligt ditt qPCR-instrument.

Obs! För LightCycler 1.2-, 1.5- och 2.0-instrument tillhandahåller varje RT-beredning cDNA för två qPCR-körningar.

Protokoll: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- eller Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument med 72-rörsrotor

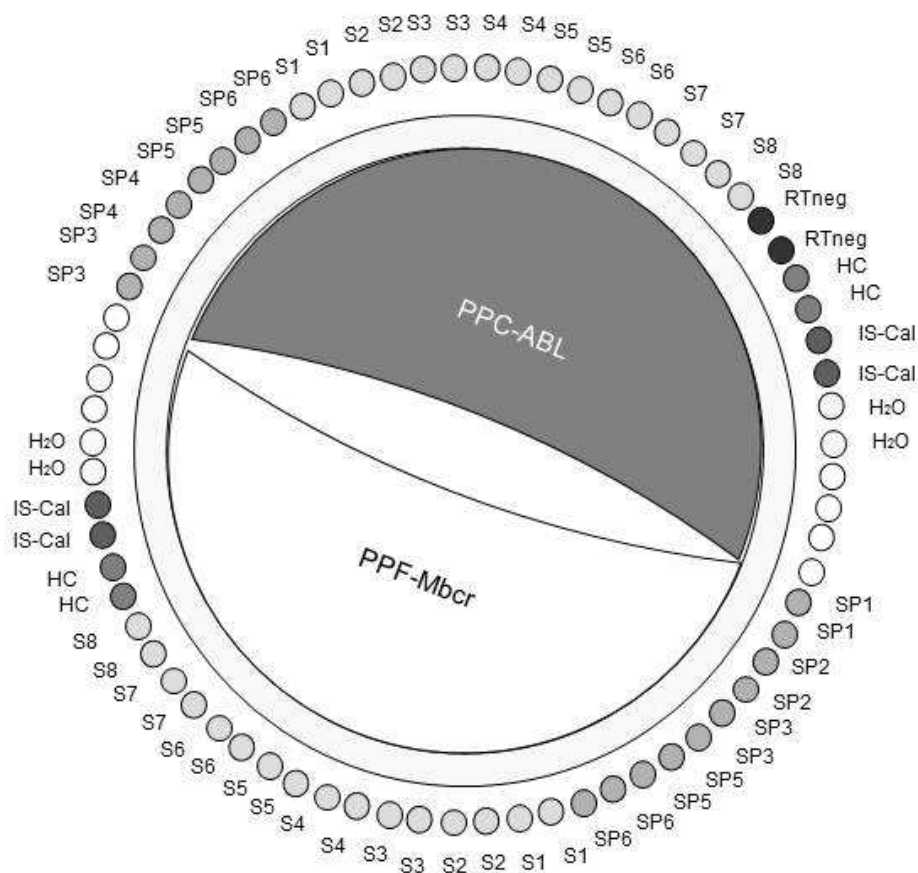
När detta instrument används rekommenderar vi att mätningar görs i duplikat, så som anges i tabell 3. Kitet är utformat för att testa 8 olika cDNA-prover i samma experiment 3 gånger.

Tabell 3. Antal reaktioner för Rotor-Gene Q-instrument med 72-rörsrotor

Prover	Reaktioner
Med ABL-primers och sökfragmentblandning (PPC-ABL) (32 reaktioner)	
8 cDNA-prover	8 x 2 reaktioner
1 cDNA höggradigt positiv kontroll	2 reaktioner
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reaktioner
Enkelplasmidstandarder	2 x 4 reaktioner (SP3, SP4, SP5 och SP6, var och en testad i duplikat)
RT-negativ kontroll	2 reaktioner
Vattenkontroll	2 reaktioner
Med BCR-ABL Mbcr-primers och sökfragmentblandning (PPF-Mbcr) (32 reaktioner)	
8 cDNA-prover	8 x 2 reaktioner
1 cDNA höggradigt positiv kontroll	2 reaktioner
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reaktioner
Enkelplasmidstandarder	2 x 5 reaktioner (SP1, SP2, SP3, SP5 och SP6, var och en testad i duplikat)
Vattenkontroll	2 reaktioner

Provbehandling på Rotor-Gene Q-instrument med 72-rörsrotor

Vi rekommenderar att minst 8 cDNA-prover testas i samma experiment för att optimera användningen av standarder, primers och sökfragmentblandningar. Rotorschemat i figur 4 visar ett exempel på ett sådant experiment.



Figur 4. Rekommenderad rotoruppställning för varje experiment med ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX-kitet. SP1–SP6: BCR-ABL MbcR- och ABL-standarder; **HC:** Högradigt cDNA-positiv kontroll; **IS-Cal:** IS-MMR-kalibrator; **RTneg:** RT-negativ kontroll; **S:** cDNA-prov; **H₂O:** vattenkontroll.

Obs! Var noga med att alltid placera ett prov som ska testas i position 1 på rotorn. I annat fall utför instrumentet ingen kalibrering under kalibreringssteget och felaktiga fluorescensdata samlas in.

Fyll alla andra positioner med tomma rör.

qPCR på Rotor-Gene Q-instrument med 72-rörsrotor

Obs! Utför alla steg på is.

Procedur

1. **Tina alla nödvändiga komponenter och placera dem på is.**
2. **Vortexblanda rören med standarder, PPF-MbcR och PPC-ABL och centrifugera kortvarigt (cirka 10 s, 10.000 varv/minut, för att samla upp vätskan i botten på röret).**

3. Bered nedanstående qPCR-blandning enligt antalet prover som ska behandlas.

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen av reaktionen.

I tabell 4 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 25 μ l. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma primers och sökfragmentblandning (antingen PPC-ABL eller PPF-Mbcr). Extra volymer är inkluderade för att kompensera för pipetteringsfel.

Tabell 4. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	1 reaktion (μ l)	ABL: 32+1 reaktioner (μ l)	BCR-ABL Mbcr: 32+1 reaktioner (μ l)	Slutlig koncentration
qPCR Mix 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primers och sökfragmentblandning, 25x	1	33	33	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	6,5	214,5	214,5	–
Prov (tillsätts i steg 5)	5	5 vardera	5 vardera	–
Total volym	25	25 vardera	25 vardera	–

3. Dispensera 20 μ l av qPCR-pre-mixen per rör.
4. Tillsätt 5 μ l av den RT-produkt (cDNA, 200 ng RNA-ekvivalent) som erhållits vid den omvända transkriptionen (se "Protokoll: Omvänd transkription", sida 14) i det motsvarande röret (total volym 25 μ l).
6. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.
7. Placera rören i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer.
8. Programmera Rotor-Gene Q-instrumentet med det termocykelprogram som anges i tabell 5.

Tabell 5. Temperaturprofil

Analyssätt	Kvantifiering
Uppehåll 1	Temperatur: 95 grader Tid: 10 s
Cykling	50 gånger 95 grader i 5 s 60 grader i 30 s med insamling av FAM-fluorescens i kanal Green (grön): Enkel
Uppehåll 2	Temperatur: 36 grader Tid: 1 min

9. Klicka på **"Gain Optimisation"** [Optimering av förstärkning] i dialogrutan **"New Run Wizard"** [Guide för ny körning] för att öppna dialogrutan **"Auto-Gain Optimisation Setup"** [Ställ in automatisk optimering av förstärkning]. Ställ in intervallet för kanalen Green från **"5 FI"** för **"Min Reading"** [Min. avläsning] till **"10 FI"** för **"Max Reading"** [Max. avläsning] och det acceptabla intervallet för Gain från **-10** till **10**.
10. Markera kryssrutan **"Perform Optimisation Before 1st Acquisition"** [Utför optimering före första hämtning] och stäng dialogrutan **"Auto-Gain Optimisation Setup"** [Ställ in automatisk optimering av förstärkning].
11. Starta termocyklingsprogrammet.
12. Välj **"Slope Correct"** [Lutning korrekt] för analysen. Vi rekommenderar att tröskeln ställs in på **0,03**.

Protokoll: qPCR på Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS och LightCycler 480-instrument

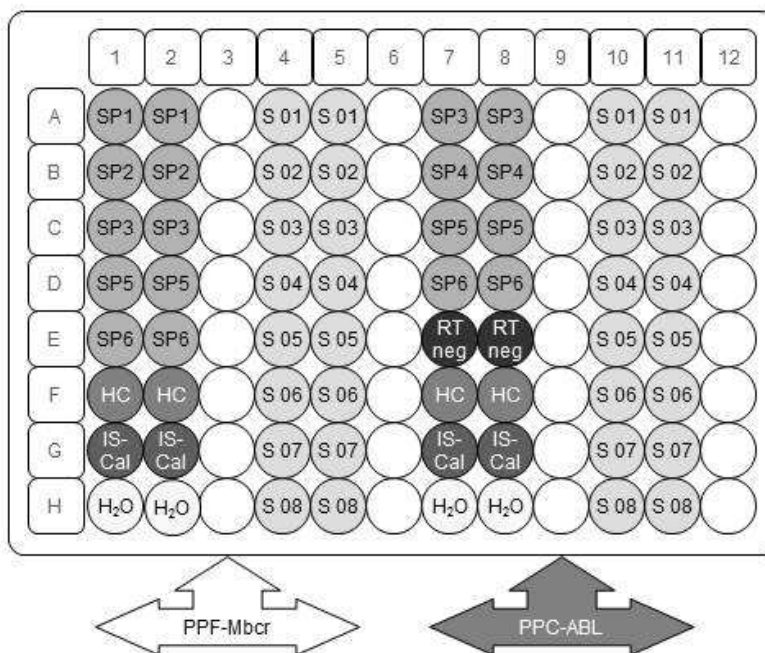
När qPCR-utrustning med 96-brunnsplattor används rekommenderar vi att alla mätningar görs i duplikat, så som anges i tabell 6. Kitet är utformat för att testa 8 olika cDNA-prover i samma experiment 3 gånger.

Tabell 6. Antal reaktioner med användning av utrustning för qPCR med 96-brunnsplattor

Prover	Reaktioner
Med ABL-primers och sökfragmentblandning (PPC-ABL) (32 reaktioner)	
8 cDNA-prover	8 x 2 reaktioner
1 cDNA höggradigt positiv kontroll	2 reaktioner
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reaktioner
Enkelplasmidstandarder	2 x 4 reaktioner (SP3, SP4, SP5 och SP6, var och en testad i duplikat)
RT-negativ kontroll	2 reaktioner
Vattenkontroll	2 reaktioner
Med BCR-ABL Mbcr-primers och sökfragmentblandning (PPF-Mbcr) (32 reaktioner)	
8 cDNA-prover	8 x 2 reaktioner
1 cDNA höggradigt positiv kontroll	2 reaktioner
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reaktioner
Enkelplasmidstandarder	2 x 5 reaktioner (SP1, SP2, SP3, SP5 och SP6, var och en testad i duplikat)
Vattenkontroll	2 reaktioner

Provbehandling på Applied Biosystems-, ABI PRISM- och LightCycler 480-instrument

Vi rekommenderar att minst 8 cDNA-prover testas i samma experiment för att optimera användningen av standarder, primers och sökfragmentblandningar. Plattschemat i figur 5 visar ett exempel på ett sådant experiment.



Figur 5. Rekommenderad plattuppställning för ett experiment med *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX-kitet. SP1–SP6: BCR-ABL Mbcr- och ABL-standarder; **HC:** Höggradigt cDNA-positiv kontroll; **IS-Cal:** IS-MMR-kalibrator; **RTneg:** RT-negativ kontroll; **S:** cDNA-prov; **H₂O:** vattenkontroll.

qPCR på Applied Biosystems-, ABI PRISM- eller LightCycler 480-instrument

Obs! Utför alla steg på is.

Procedur

1. Tina alla nödvändiga komponenter och placera dem på is.
2. Vortexblanda rören med standarder, PPF-Mbcr och PPC-ABL och centrifugera kortvarigt (cirka 10 s, 10.000 varv/minut, för att samla upp vätskan i botten på röret).
3. 2. Bered nedanstående qPCR-blandning enligt antalet prover som ska behandlas. Om utrustningen för qPCR med 96-brunnsplattor används rekommenderar vi att alla mätningar görs i duplikat.

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen av reaktionen.

I tabell 7 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning för Applied Biosystems- och ABI PRISM-instrument, beräknad att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 25 µl. I tabell 8 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning för LightCycler 480-instrumentet, beräknad att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 25 µl. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma primers och sökfragmentblandning (antingen PPC-ABL eller PPF-Mbcr). Extra volymer är inkluderade för att kompensera för pipetteringsfel.

Tabell 7. Beredning av qPCR-blandning för Applied Biosystems- och ABI PRISM-instrument

Komponent	1 reaktion (µl)	ABL: 32+1 reaktioner (µl)	BCR-ABL Mbcr: 32+1 reaktioner (µl)	Slutlig koncentration
qPCR Mix 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primers och sökfragment- blandning, 25x	1	33	33	1x
ROX I-färg, 50x (ABI PRISM 7900HT) eller ROX II-färg, 50x (Applied Biosystems 7500)	0,5	16,5	16,5	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	6	198	198	–
Prov (tillsätts i steg 5)	5	5 vardera	5 vardera	–
Total volym	25	25 vardera	25 vardera	–

Tabell 8. Beredning av qPCR-blandning för LightCycler 480

Komponent	1 reaktion (μl)	ABL: 32+1 reaktioner (μl)	BCR-ABL Mbc: 32+1 reaktioner (μl)	Slutlig koncentration
qPCR Mix 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primers och sökfragment- blandning, 25x	1	33	33	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	6,5	214,5	214,5	–
Prov (tillsätts i steg 5)	5	5 vardera	5 vardera	–
Total volym	25	25 vardera	25 vardera	–

- 3. Dispensera 20 μ l av qPCR-pre-mixen per brunn.**
- 5. Tillsätt 5 μ l av den RT-produkt (cDNA, 200 ng RNA-ekvivalent) som erhållits vid den omvända transkriptionen (se "Protokoll: Omvänd transkription", sida 14) i den motsvarande brunnen (total volym 25 μ l).**
- 6. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.**
- 7. Förslut plattan och centrifugera kortvarigt (300 x g, cirka 10 s).**
- 8. Placera plattan i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer. Programmera termocykeln med termocykelprogrammet så som anges i tabell 9 för Applied Biosystems- och ABI PRISM-instrument, eller tabell 10 för LightCycler 480-instrumentet.**

Tabell 9. Temperaturprofil för Applied Biosystems- och ABI PRISM-instrument

Analyssätt	Standardkurva – absolut kvantifiering
Uppehåll 1	Temperatur: 95 °C Tid: 10 s
Cykling	50 gånger 95 °C i 5 s 60 °C i 30 s med insamling av FAM-fluorescens: Enkel; quencher: TAMRA
Uppehåll 2	Temperatur: 36 °C Tid: 1 min

Tabell 10. Temperaturprofil för LightCycler 480-instrument

Analyssätt	Absolut kvantifiering ("Abs kvant")
Detektionsformat	Välj "Simple Probe" (enkelt sökfragment) i fönstret Detection formats (detektionsformat)
Uppehåll 1	Temperatur: 95 °C Tid: 10 s
Cykling	50 gånger 95 °C i 5 s 60 °C i 30 s med insamling av FAM-fluorescens motsvarande (483–533 nm) för LC-version 01 och (465–510 nm) för LC-version 02
Uppehåll 2	Temperatur: 36 °C Tid: 1 min

- 9. För Applied Biosystems 7500 och ABI PRISM 7900HT SDS, följ steg 9a. För LightCycler 480-instrumentet, följ steg 9b.**
- 9a. Applied Biosystems och ABI PRISM: Vi rekommenderar en tröskelinställning på 0,1 i analyssteget på instrumentet. Starta cykelprogrammet så som anges i tabell 9.**
- 9b. LightCycler 480-instrument: Vi rekommenderar ett Fit point-analyssätt med bakgrund vid 2,0 och tröskel vid 2,0. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 10.**

Protokoll: qPCR på LightCycler 1.2-, 1.5- och 2.0-instrument

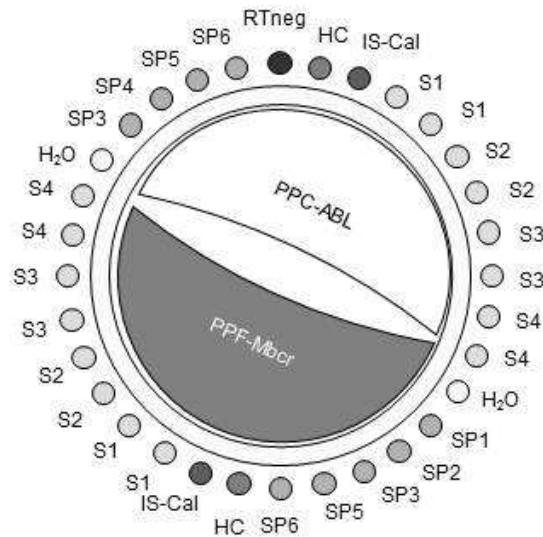
När kapillärinstrument används rekommenderar vi att prover mäts i duplikat och kontroller endast en gång, så som anges i tabell 11. Kitet är utformat för att testa 4 olika cDNA-prover i samma experiment 6 gånger.

Tabell 11. Antal reaktioner för LightCycler 1.2-, 1.5- och 2.0-instrument

Prover	Reaktioner
Med ABL-primers och sökfragmentblandning (PPC-ABL) (16 reaktioner)	
4 cDNA-prover	4 x 2 reaktioner
1 cDNA höggradigt positiv kontroll	1 reaktion
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	1 reaktion
Enkelplasmidstandarder	1 x 4 reaktioner (SP3, SP4, SP5 och SP6)
RT-negativ kontroll	1 reaktion
Vattenkontroll	1 reaktion
Med BCR-ABL Mbcr-primers och sökfragmentblandning (PPF-Mbcr) (16 reaktioner)	
4 cDNA-prover	4 x 2 reaktioner
1 cDNA höggradigt positiv kontroll	1 reaktion
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	1 reaktion
Enkelplasmidstandarder	1 x 5 reaktioner (SP1, SP2, SP3, SP5 och SP6)
Vattenkontroll	1 reaktion

Provbehandling på LightCycler 1.2-, 1.5- och 2.0-instrument

Vi rekommenderar att minst 4 cDNA-prover testas i samma experiment för att optimera användningen av standarder, primers och sökfragmentblandningar. Kapillärschemat i figur 6 visar ett exempel på ett experiment.



Figur 6. Rekommenderad rotoruppställning för varje experiment med *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX-kitet. SP1–SP6: BCR-ABL Mbcr- och ABL-standarder; **HC:** Högggradigt cDNA-positiv kontroll; **IS-Cal:** IS-MMR-kalibrator; **RTneg:** RT-negativ kontroll; **S:** cDNA-prov; **H₂O:** vattenkontroll.

qPCR på LightCycler 1.2-, 1.5- och 2.0-instrument

Obs! Utför alla steg på is.

Procedur

1. **Tina alla nödvändiga komponenter och placera dem på is.**
2. **Vortexblanda rören med standarder, PPF-Mbcr och PPC-ABL och centrifugera kortvarigt (cirka 10 s, 10.000 varv/minut, för att samla upp vätskan i botten på röret).**
3. **Bered nedanstående qPCR-blandning enligt antalet prover som ska behandlas.**

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen av reaktionen.

I tabell 12 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 20 µl. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma primers och sökfragmentblandning (antingen PPC-ABL eller PPF-Mbcr). Extra volymer är inkluderade för att kompensera för pipetteringsfel.

Tabell 12. Beredning av qPCR-blandning för LightCycler 1.2-, 1.5- och 2.0-instrument

Komponent	1 reaktion (μl)	ABL: 16+1 reaktioner (μl)	BCR-ABL Mbc: 16+1 reaktioner (μl)	Slutlig koncentration
qPCR Mix 2x	10	170	170	1x
Primers och sökfragment- blandning, 25x	0,8	13,6	13,6	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	4,2	71,4	71,4	–
Prov (tillsätts i steg 5)	5	5 vardera	5 vardera	–
Total volym	20	20 vardera	20 vardera	–

4. **Dispensera 15 μ l av qPCR-pre-mixen per kapillär.**
5. **Tillsätt 5 μ l av den RT-produkt (cDNA, 200 ng RNA-ekvivalent) som erhållits vid den omvända transkriptionen (se "Protokoll: Omvänd transkription", sida 14) i den motsvarande brunnen (total volym 25 μ l).**
6. **Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.**
7. **6. Placera kapillärerna i adaptrarna som medföljde apparaten och centrifugera kortvarigt (700 x g, cirka 10 s).**
8. **Ladda kapillärerna i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer.**
9. **Programmera LightCycler 1.2-, 1.5- eller 2.0-instrumentet med det termocykelprogram som anges i tabell 13.**

Tabell 13. Temperaturprofil

Analyssätt	Kvantifiering
Uppehåll 1	Temperatur: 95 °C Tid: 10 s Ramp: 20
Cykling	50 gånger 95 °C i 5 s; ramp: 20 60 °C i 30 s; ramp: 20; med insamling av FAM-fluorescens: Enkel
Uppehåll 2	Temperatur: 36 °C Tid: 1 min Ramp: 20

10. För LightCycler 1.2 och 1.5, följ steg 10a. För LightCycler 2.0, följ steg 10b.

10a. LightCycler 1.2 och 1.5: Läget F1/F2 och "2nd derivative analysis" (2:a derivatanalys) rekommenderas. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 13.

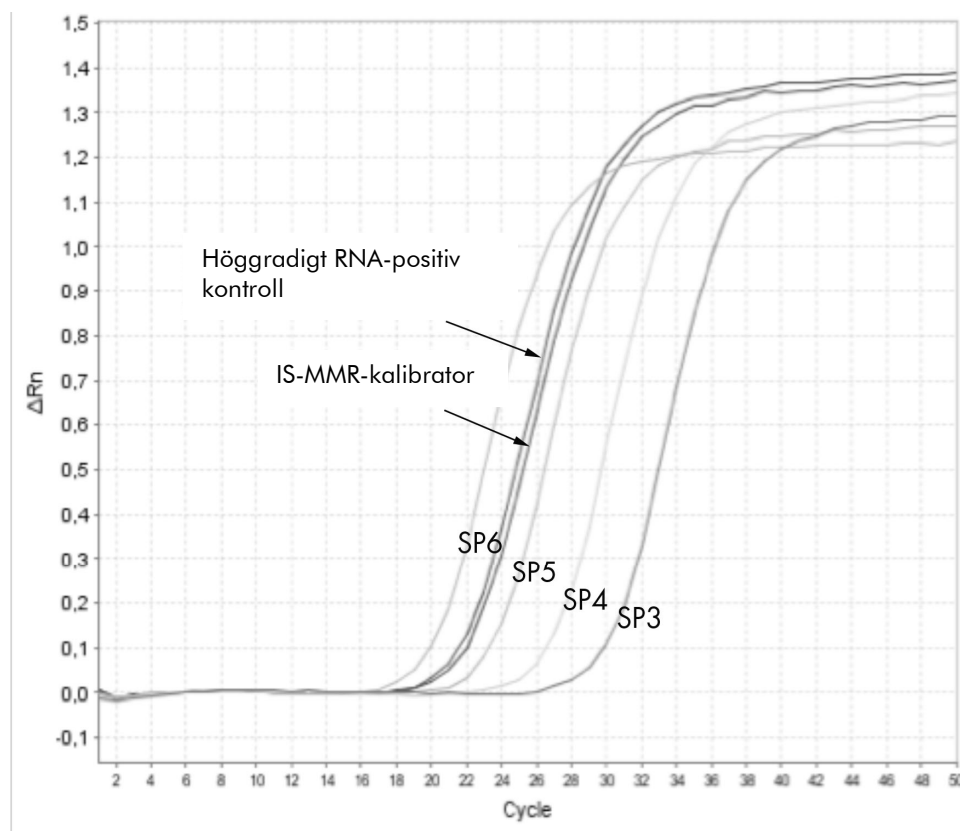
10b. LightCycler 2.0: Vi rekommenderar användningen av automatiserad (F''max) analys på LightCycler 2.0 programversion 4.0 för att erhålla reproducerbara resultat. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 13.

Tolkning av resultat

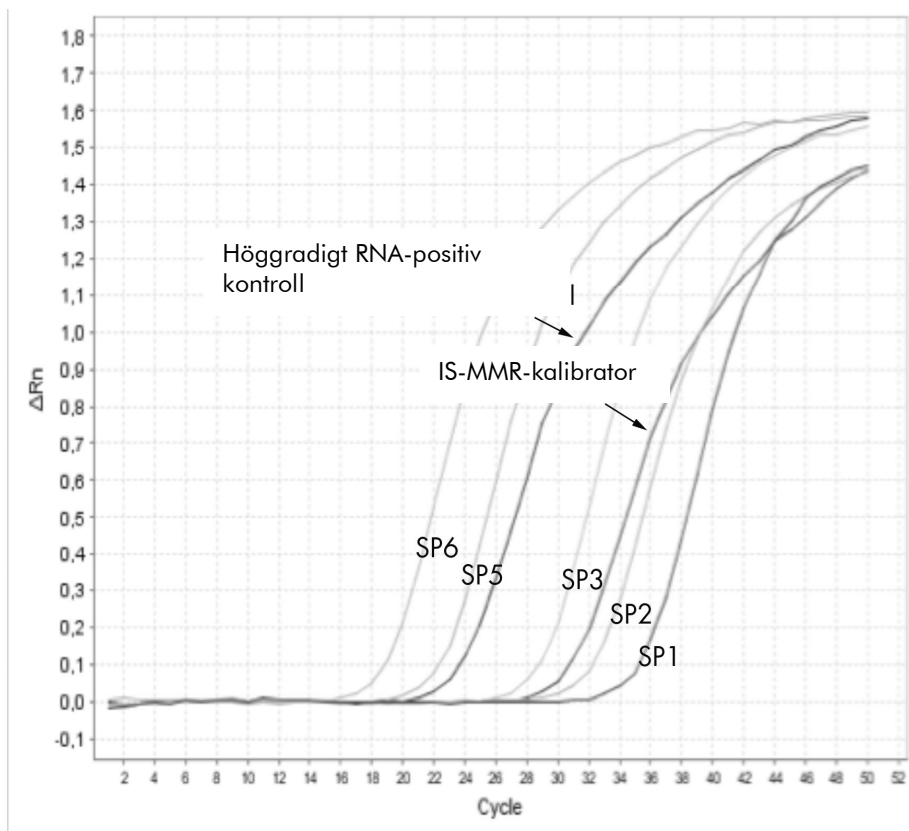
Dataanalysprincip

När TaqMan[®]-tekniken används, kallas antalet PCR-cykler som behövs för att detektera en signal ovanför tröskeln för tröskelcykeln (C_T) och är direkt proportionell till mängden mål som finns i början av reaktionen.

När man använder standarder med ett känt antal molekyler, kan man fastställa en standardkurva och bestämma den exakta mängden mål som finns i testprovet. När man använder standarder med ett känt antal molekyler, kan man fastställa en standardkurva och bestämma den exakta mängden mål som finns i testprovet. *ipsogen*-standardkurvorna är plasmidbaserade. För att säkert få noggranna standardkurvor använder vi 4 standardspädningar för ABL och 5 standardspädningar för Mbc. I kitet ingår även en IS-MMR-kalibrator som möjliggör konvertering av resultat till den internationella skalan. I figur 7 och 8 visas exempel på TaqMan-amplifieringskurvor som erhållits för standarder, IS-MMR-kalibratoren och den höggradigt positiva RNA-kontrollen med *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR DX-kitet.



Figur 7. Detektion av ABL med standard SP3, SP4, SP5 och SP6. 10^3 , 10^4 , 10^5 och 10^6 kopior/ $5 \mu\text{l}$.



Figur 8. Detektion av BCR-ABL Mbc med standard SP1, SP2, SP3, SP5 och SP6. 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 kopior/ $5 \mu\text{l}$.

Standardkurvor och kvalitetskriterier som är tillämpliga på rådata

Reproducerbarhet mellan replikat

Variationen i C_T -värden mellan replikat ska vara <2 , vilket motsvarar en fyrfaldig förändring av kopiaantalvärdena.

Variation i C_T -värden mellan replikat är generellt $<1,5$ om det genomsnittliga C_T -värdet för replikaten är <36 (7).

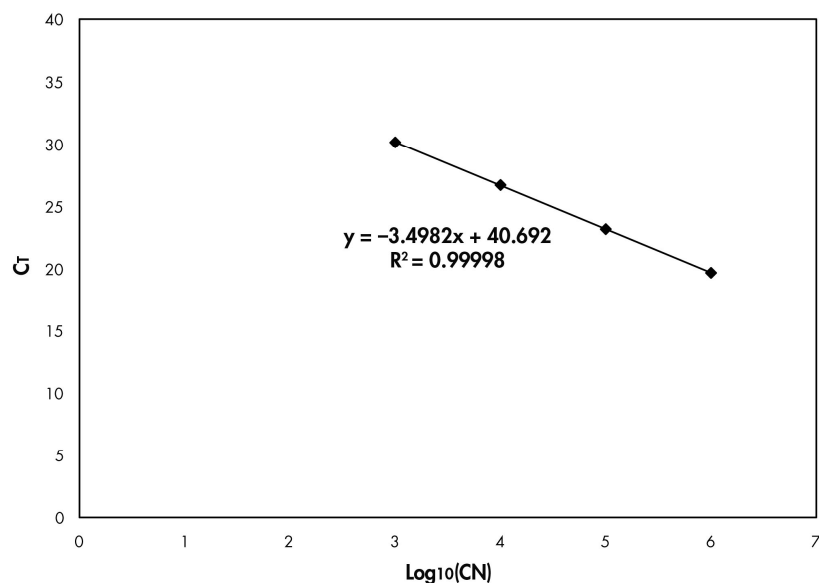
Obs! Varje användare bör mäta den egna reproducerbarheten i sitt laboratorium.

Standardkurvor

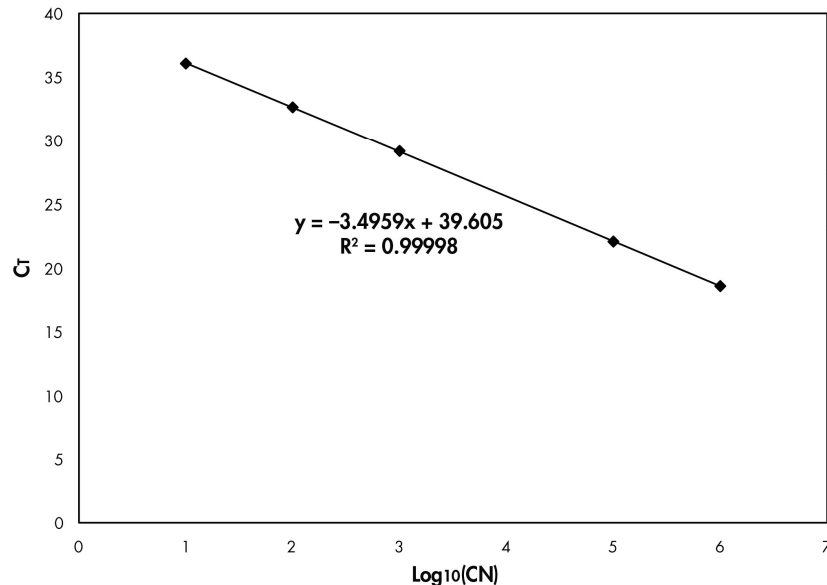
Rådata kan klistras in i en Excel[®]-fil för att analyseras.

För varje gen (ABL och BCR-ABL), ritas råa C_T -värden in som erhållits från plasmidstandardspädningar i enlighet med log-kopieantalet (3, 4, 5 och 6 för SP3, SP4, SP5 och SP6; 1, 2, 3, 5 och 6 för SP1, SP2, SP3, SP5 och SP6). I figur 9 visas ett exempel på den teoretiska ABL-kurvan som beräknats på 4

standardspädningar. I figur 10 visas ett exempel på den teoretiska BCR-ABL-kurvan som beräknats på 5 standardspädningar.



Figur 9. Teoretisk standardkurva för ABL beräknad från 4 standardspädningar. En linjär regressionskurva ($y = ax + b$) beräknas, där a är linjens lutning och b är y -skärningspunkten, vilket är y -koordinaten för den punkt där linjen korsar y -axeln. Dess ekvation och bestämningskoefficient (R^2) är tryckta på grafen.



Figur 10. Teoretisk kurva för BCR-ABL beräknad från 5 standardspädningar. En linjär regressionskurva ($y = ax + b$) beräknas, där a är linjens lutning och b är y -skärningspunkten, vilket är y -koordinaten för den punkt där linjen korsar y -axeln. Dess ekvation och bestämningskoefficient (R^2) är tryckta på grafen.

Eftersom standarder är tiofaldiga spädningar, är kurvans teoretiska lutning -3,3. En kurva mellan -3,0 och -3,9 är godtagbar så länge R^2 är $>0,95$ (7). Ett värde för R^2 som är $>0,98$ är dock önskvärt för att få exakta resultat (3).

Obs! SP1-standardspädningen (BCR-ABL-plasmid, 10 kopior) måste detekteras och inkluderas i BCR-ABL-standardkurvan.

Kvalitetskontroll på alla ABL-värden

Dålig kvalitet för RNA eller problem under qPCR-stegen leder till låga ABL-kopieantal (ABL_{CN}). Optimal känslighet uppnås med prover som ger $ABL_{CN} \geq 10.000$ kopior. Detta kriterium för ABL_{CN} gäller även för den höggradigt positiva RNA-kontrollen och IS-MMR-kalibratoren.

RT-negativa och vattenkontroller

Kontroller utan templat (no template controls, NTC) för PCR-steget (vattenkontroll) och det omvända transkriptionssteget (RT-negativ kontroll) ska ge noll CN för både ABL och BCR-ABL Mbc. Ett positivt resultat för dessa NTC:er indikerar korskontamination under omvänd transkription och/eller qPCR.

Normaliserat kopieantal (normalized copy number, NCN)

Ekvationen för ABL-standardkurvan ska användas för att omvandla råa C_T -värden (erhållna med PPC-ABL) för de okända proven till ABL-kopieantal (ABL_{CN}).

Ekvationen för standardkurvan BCR-ABL ska användas för att omvandla råa C_T -värden (erhållna med PPF-Mbc) för de okända proven, till BCR-ABL-kopieantal ($BCR-ABL_{Mbc_{CN}}$).

Kvoten för dessa CN-värden ger det normaliserade kopieantalet (NCN):

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

Beräkna NCN-resultatet för den höggradigt positiva RNA-kontrollen (NCN_{HC}), ISMMR-kalibratoren (NCN_{cal}) och varje prov (NCN_{sample}).

Höggradigt positiv RNA-kontroll och IS-MMR-kalibrator

Dessa kontroller gör det möjligt att övervaka stegen med omvänd transkription och amplifiering för ABL och BCR-ABL Mbc under transkriptkvantifiering.

Kvalitetskontroll på NCN_{cal} -resultat

Obs! NCN -resultatet som erhålls för IS-MMR-kalibratoren, testat med *ipsogen* BCR-ABL Mbc IS-MMR DX-kitet i kombination med validerade reagenser och

instrument (se "Material som medföljer", sida 9, och "Material som behövs men inte medföljer", sida 11), måste ligga inom intervallet 0,05–0,3. Annars kan inte NCN-värden konverteras till den internationella skalan. Vidare måste hela experimentet förkastas om den höggradigt positiva RNA-kontrollen inte detekteras.

IS-konvertering och MMR-rapportering

Obs! Före tolkning, se värdet som anges på IS-MMR-kalibratorrörets etikett, eller på analyscertifikatet som medföljer kitet.

Använd det experimentella NCN-resultatet för IS-MMR-kalibratoren (NCN_{cal}), och dess tilldelade värde (IS-Cal value) som anges i analyscertifikatet, för att beräkna det normaliserade kopiaantalet på den internationella skalan (IS- NCN_{sample}).

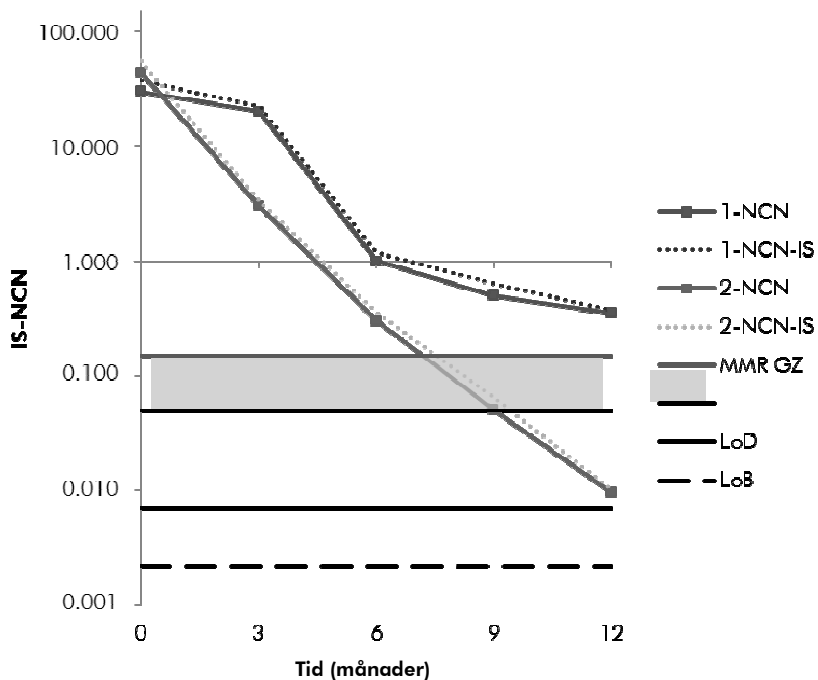
$$IS-NCN_{sample} = \frac{NCN_{sample} \times IS-Cal\text{-värde}}{NCN_{cal}}$$

Bestäm MMR-status för varje prov enligt nedanstående kriterier.

- **IS- $NCN_{sample} \leq 0,05$** : MMR (major molecular response)
- **$0,05 < IS-NCN_{sample} < 0,15$** : Gråzon runt MMR-cutoff, inte avgörande resultat
- **IS- $NCN_{sample} \leq 0,15$** : Ingen MMR (major molecular response)

IS- NCN_{HC} -resultatet (NCN på den internationella skalan för den höggradigt positiva RNA-kontrollen) ska inte ge någon MMR (major molecular response).

I figur 11 visas ett exempel på patientövervakning med användning av NCN- och IS-NCN-resultat.



Figur 11. Övervakningskurvor för patients MMR-status med *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX-kitet. NCN: normaliserat kopieantal; NCN-IS: normaliserat kopieantal, internationell skala; MMR GZ: MMR-gråzon (GZ), inte avgörande resultat; LoD: gräns för detektion; LoB: bakgrunds nivå.

Sammanfattning av kvalitetskriterier

I tabell 14 sammanfattas de olika kvalitetskriterierna och associerade värden eller resultat.

Tabell 14. Sammanfattning av kvalitetskriterier

Kriterier	Godtagbara värden/resultat
Variationer i C_T -värden mellan replikat	$\leq 2 C_T$ om genomsnittligt C_T -värde är > 36 $\leq 1,5 C_T$ om genomsnittligt C_T -värde är > 36
Lutning för standardkurvor	Mellan -3,0 och -3,9
R^2 för standardkurvor	Minst $> 0,95$ bättre om $> 0,98$
SP1-standardspädning (BCR-ABL 10 kopior plasmid)	Måste detekteras och inkluderas i standardkurvan
Kvalitetskontroll på ABL_{CN} -värde för patientprover, höggradigt positiv RNA-kontroll och IS-MMR-kalibratorn	$ABL_{CN} > 10.000$ kopior av ABL för att uppnå optimal känslighet
Kontroller för PCR (vatten) och omvänd transkription (RT-negativa)	För varje $ABL_{CN} = 0$ och $M_{bcr_{CN}} = 0$
NCN erhållen för IS-MMR-kalibratör (NCN_{cal})	Måste ligga inom intervallet 0,05–0,3
Höggradigt positiv RNA-kontroll	Måste detekteras
NCN erhållen för den höggradigt positiva RNA-kontrollen konverterad till den internationella skalan ($IS-NCN_{HC}$)	Status: Ingen MMR (major molecular response)

Felsökning

För ytterligare information, se sidan vanliga frågor på vårt tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Dessutom svarar teamet för QIAGEN:s tekniska service gärna på frågor om antingen informationen och protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (för kontaktinformation, se "Kontaktinformation", sida 43).

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lotnummer av *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit med fastställda specifikationer enligt QIAGENs ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem. Analyscertifikat finns tillgängliga på begäran på www.qiagen.com/support/.

Begränsningar

Användarna måste vara utbildade i och förtrogna med denna teknologi innan produkten används.

Alla diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med övriga kliniska fynd eller laboratoriefynd. Det är användarnas ansvar att validera systemets prestanda för eventuella procedurer som används i deras laboratorium som inte ingår i QIAGENs prestandastudier.

Var noga med att uppmärksamma de utgångsdatum som är angivna på kartongen och etiketterna för alla komponenter. Använd inte utgångna komponenter.

Obs! Kitet har utformats i enlighet med studierna "Europe Against Cancer" (EAC) (8, 9) och överensstämmer med de uppdaterade internationella rekommendationerna. Kitet innehåller en IS-MMR-kalibrator, standardiserad enligt den internationella skalan, vilket gör det möjligt att konvertera NCN-resultat till den internationella skalan och rapportera status för MMR (major molecular response).

Varje lot av IS-MMR-kalibratören har ett tilldelat värde som erhållits direkt från en kalibrering mot det NIBSC WHO-certifierade primära referensmaterialet (International Genetic Reference Panel for the quantitation of BCR-ABL translocation by RQ-PCR (1st I.S.), ref. 09/138).

Ett analyscertifikat som anger det tilldelade värdet för IS-MMR-kalibratören medföljer varje kit.

Kitet ska användas i enlighet med anvisningarna i denna handbok, i kombination med validerade reagenser och instrument (se "Material som behövs men inte medföljer", sida 11). Om denna produkt används utanför indikationen och/eller om komponenterna modifieras, upphör ansvarsskyldigheten för QIAGEN.

Prestandaegenskaper

Obs! Prestandaegenskaperna fastställdes med användning av Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System i kombination med *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR-kitet och validerade extra reagenser (se "Material som behövs men inte medföljer", sida 11).

Gräns för blankprov och gräns för detektion

Gräns för blankprov (limit of blank, LoB) och gräns för detektion (limit of detection, LoD) bestämdes enligt riktlinjen CLSI/NCCLS EP17-A.

Bakgrundsnivån (LoB) bestämdes på negativa prover från friska givare (11 prover, 69 mätningar) och befanns vara lika med 0,0022 BCR-ABL Mbc r NCN.

Gränsen för detektion (LoD eller analytisk känslighet) bestämdes på kända låga positiva prover (n = 8, 74 mätningar) och befanns vara lika med 0,0069 BCR-ABL Mbc r NCN.

- **NCN ≤ LoB:** BCR-ABL Mbc r ej detekterad
- **LoB < NCN < LoD:** BCR-ABL Mbc r detekterad men ej kvantifierad
- **NCN ≥ LoD:** BCR-ABL Mbc r kvantifierad

Linjäritet

Linjäritet bestämdes enligt riktlinjen CLSI/NCCLS EP6-A.

Studien utfördes på blandningar av positivt och negativt RNA som extraherats från cellinjer. Elva olika nivåer testades i triplikat. Resultaten som erhöles på dessa prover visar att *ipsogen* BCR-ABL Mbc r IS-MMR-analysen är linjär i ett intervall från 0,003 till 65 BCR-ABL Mbc r NCN.

Inmatningar

Fem olika RNA:er med olika nivåer av NCN BCR-ABL Mbc r valdes ut för studien. Olika RNA- och cDNA-mängder testades för att utvärdera inmatningspåverkan på NCN-resultat. Resultat visade att RNA-inmatningsvariationen hade en begränsad påverkan på NCN-resultat, medan cDNA-inmatning var en känsligare faktor om mer eller mindre material används. Därför rekommenderas en inmatning på 1 µg RNA och 5 µl cDNA för att köra testet.

Precision

Precision bestämdes enligt riktlinjen CLSI/NCCLS EP5-A2.

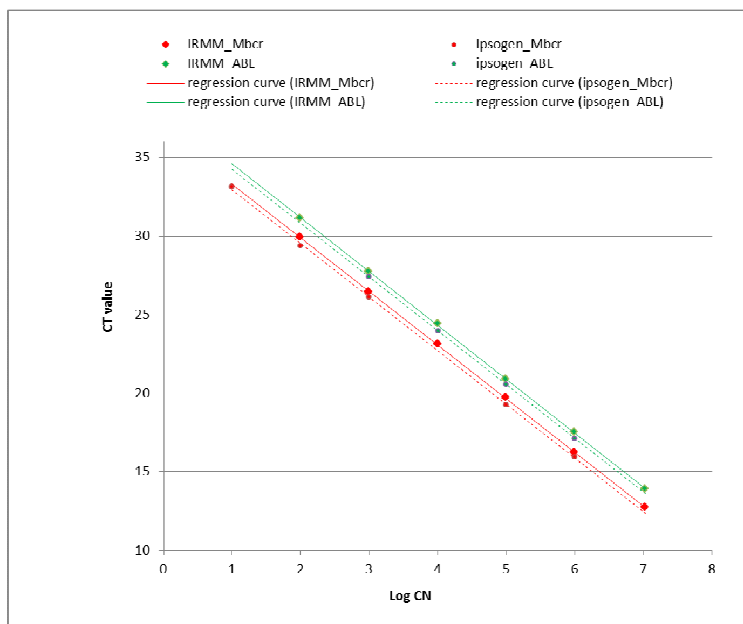
Precisionsstudien utfördes på 13 olika prover som testades 42 gånger i duplikat (n = 84). Dessa prover var representativa för den annorlunda nivån av BCR-ABL Mbc r-uttryck i patienters prover omkring och över MMR-värdet. Den globala variationskoefficienten omkring MMR-värdet befanns vara lika med 25 %.

Studie av överensstämmelse: ERM-AD623 BCR-ABL1-enkelplasmidstandard (IRMM) jämfört med ipsogen-enkelplasmidstandard (QIAGEN)

De senaste arbetsdefinitionerna för molekylär respons hos BCR-ABL1 MbcR i CML tillhandahålls av ELN/EUTOS Molecular Monitoring Steering Group, som rekommenderar användning av plasmiden ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM, Belgien): Cross, N.C., et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia (2015) *Leukemia*. **29**, 999.

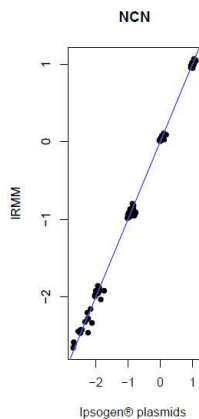
För att följa denna rekommendation genomförde QIAGEN en överensstämmelsestudie och jämförde den multi-target *ipsogen*-enkelplasmid som användes i *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR-kitet (24) CE (kat.nr 670723) med ERM-AD623 BCR-ABL1-plasmiden (IRMM).

Jämförelsen baserades på det normaliserade antalet kopior (NCN) för BCR-ABL1 MbcR/ABL1 och bedömdes med hjälp av en av de två standardspädningarna (*ipsogen* eller ERM-AD623 BCR-ABL1) på kontrollprover som ingår i *ipsogen*-kit och på certifierat referensmaterial från 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.



regressionskurva
 C_T-värde
 Log CN

Bild 12. Standardkurvorna för *ipsogen*- och ERM-AD623 BCR-ABL1-plasmiderna bildar



NCN
 IRMM
ipsogen®-plasmider
ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit.

Bild 13. ERM-AD623 BCR-ABL1 jämfört med *ipsogen* NCN-värden.

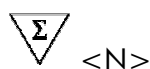
QIAGEN-studien fastställer att det inte finns någon statistisk skillnad: ERM-AD623 BCR-ABL1-enkelplasmidstandarden och *ipsogen*-enkelplasmidstandarden ger likvärdiga resultat.

Litteraturhänvisningar

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.

Symboler

Följande symboler kan förekomma på förpackning och märkning:



Innehåller reagenser som räcker för <N> reaktioner



Använd före



Medicinsk utrustning för in vitro-diagnostik



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer



Globalt nummer på handelsvara



Temperaturbegränsningar



Tillverkare



Konsultera bruksanvisningen

Kontaktinformation

För teknisk hjälp och ytterligare information, besök vårt tekniska supportcenter på **www.qiagen.com/Support**, ring 00800-22-44-6000 eller kontakta en av QIAGENS tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök **www.qiagen.com**).

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit (24)	För 24 reaktioner: Omvänd transkriptas, 5x RT-buffert, dNTP mix, random (slumpmässig) primer, RNase-hämmare, DTT, qPCR Master mix, MbcR och ABL enkelplasmidstandarder, höggradigt RNA-positiv kontroll, IS-MMR-kalibrator, ROX I fluorescensfärg, ROX II fluorescensfärg, primers och sökfragmentblandning ABL, primers och sökfragmentblandning BCR-ABL MbcR fusionsgen	670823
Rotor-Gene Q MDx — för IVD-validerad realtids PCR-analys i kliniska applikationer		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	PCR-cykler i realtid och analysator med högupplösningssmältning och fem kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, laptopdator, program, tillbehör och ett års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning ingår inte	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	PCR-cykler i realtid och analysator med högupplösningssmältning och fem kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, laptopdator, program, tillbehör och ett års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning	9002033
RNeasy Kits — för rening av totalt RNA		
RNeasy Mini Kit (50)	För 50 RNA-beredningar: 50 RNeasy mini-spinnkolonner, provrör (1,5 ml och 2 ml), RNase-fria reagenser och buffertar	74104
RNeasy Midi Kit (50)	För 50 RNA-beredningar: 50 RNeasy midi-spinnkolonner, provrör (15 ml), RNase-fria reagenser och buffertar	75144

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler: se respektive QIAGEN-kithandbok eller användarhandbok. Handböcker och användarhandböcker för QIAGEN-kit finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGENS tekniska support eller från lokal distributör.

Denna produkt är avsedd att användas för in vitro-diagnostik. *ipsogen*-produkter får inte återförsäljas, modifieras för återförsäljning eller användas för att tillverka kommersiella produkter utan skriftligt godkännande från QIAGEN.

Informationen i detta dokument kan ändras utan föregående meddelande. QIAGEN tar inget ansvar för eventuella fel som kan finnas i detta dokument. Detta dokument betraktas som komplett och riktigt vid tiden för publicering. Under inga omständigheter är QIAGEN ansvarigt för tillfälliga, speciella eller multipla skador eller följskador i samband med, eller på grund av användningen av detta dokument.

ipsogen-produkter är garanterade att motsvara deras angivna specifikationer. QIAGENS enda åtagande och kundens enda gottgörelse är begränsad till ersättning av produkter utan kostnad om produkter inte skulle fungera enligt garantin.

Den här produkten innehåller SuperScript® III Omvänd transkriptas som som är föremål för ett eller flera utfärdade, amerikanska patent eller inlämnade amerikanska patentansökningar, och motsvarande icke-amerikanska patent, ägs av Life Technologies Corporation och säljs enligt ett avtal mellan Life Technologies Corporation och Ipsogen. Inköpspriset för denna produkt omfattar begränsade, icke överförbara rättigheter enligt förut nämnda patent när det gäller användning av denna mängd produkt för att rättsanspråken i dessa patent ska kunna tillämpas enbart för köparens verksamhet när det gäller mätning av BCR-ABL p210-transkriptas. Inga andra rättigheter, inklusive rätten att använda denna produkt för tillämpningar inom kriminalteknik, överföres. Mer information angående förvärv av rättigheter enligt patent som ägs av Life Technologies Corporation kan erhållas genom kontakt med licensavdelning, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. (760) 603-7200. E-post: Outlicensing@lifetech.com.

Varumärken: QIAGEN®, *ipsogen*®, RNeasy®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, ROX™, SuperScript®, SYBR®, TAMRA™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Excel® (Microsoft Corporation); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); TRIzol® (Molecular Research Center, Inc.).

Begränsat licensavtal

Användningen av denna produkt innebär att en köpare eller användare av *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR-kitet samtycker till följande villkor:

1. *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR- DX-kitet får endast användas i enlighet med handboken för *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR-kitet och endast i kombination med komponenter som ingår i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i kitet, förutom det som beskrivs i handboken för *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR DX-kitet och ytterligare protokoll som finns tillgängliga på www.qiagen.com.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Detta kit och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, renoveras eller säljas vidare.
4. QIAGEN frånsäger sig specifikt alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, bortsett från dem som uttryckligen angivits.
5. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuellt försök att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av sina immateriella rättigheter avseende kitet och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

HB-1393-003 © 2013–2016 QIAGEN, med ensamrätt.

www.qiagen.com

