

Novembro 2017

# Manual do kit *ipsogen*<sup>®</sup>

## PML-RARA bcr1



Versão 1

Diagnóstico in vitro quantitativo

Para usar com instrumentos Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, ABI PRISM<sup>®</sup>, Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Real-Time PCR System, LightCycler<sup>®</sup> e SmartCycler<sup>®</sup>

**IVD**

**CE**

**REF**

672123

QIAGEN GmbH

QIAGEN Strasse 1,

40724 Hilden

GERMANY



R5 **MAT**

1108718PT

# Índice

Finalidade da utilização.....	4
Resumo e explicação .....	4
Princípio do procedimento.....	7
Materiais fornecidos .....	10
Conteúdo do kit .....	10
Materiais necessários, mas não fornecidos .....	11
Avisos e precauções .....	13
Precauções gerais .....	13
Armazenamento e manuseamento de reagente .....	15
Procedimento .....	16
Preparação da amostra de ARN .....	16
Protocolo: transcrição reversa EAC normalizada recomendada .....	16
Protocolo: qPCR em instrumentos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ou Rotor-Gene Q 5plex HRM com rotor de 72 tubos .....	19
Protocolo: qPCR em ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System e instrumento LightCycler 480 .....	23
Protocolo: qPCR em instrumentos LightCycler 1.2 e 2.0.....	28
Protocolo: qPCR no instrumento SmartCycler.....	32
Interpretação dos resultados .....	36
Princípio de análise de dados.....	36
Results (Resultados).....	37
Guia de resolução de problemas .....	41

---

Controlo da qualidade .....	44
Limitações .....	44
Características de desempenho .....	45
Estudos não clínicos.....	45
Estudos clínicos .....	48
Referências .....	53
Símbolos .....	54
Informações para encomenda .....	56

---

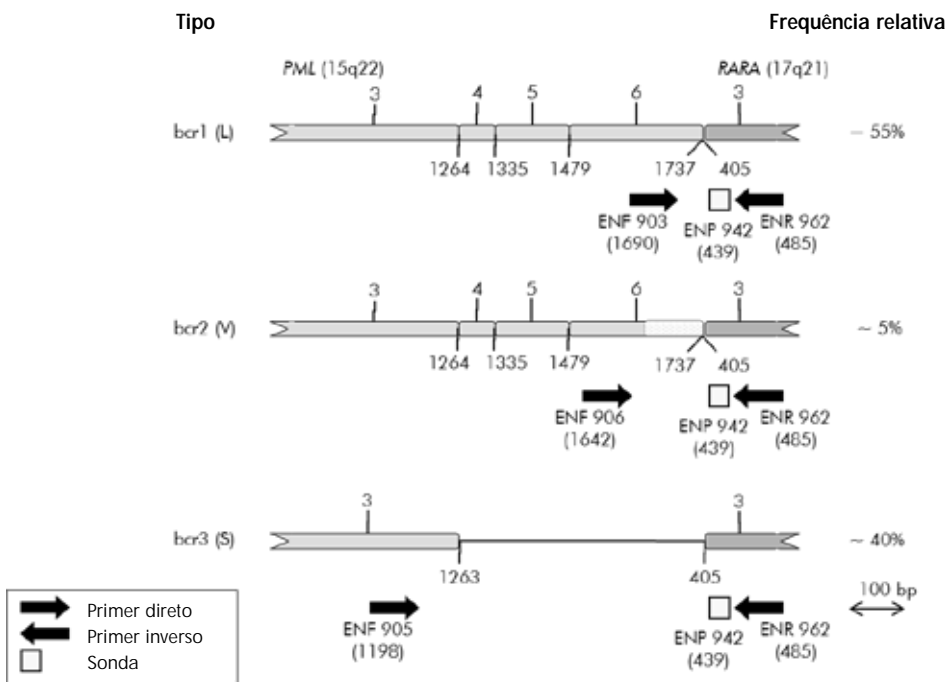
## Finalidade da utilização

O kit *ipsogen* PML-RARA bcr1 destina-se à quantificação de transcritos de fusão PML-RARA tipo bcr1 em amostras de medula óssea ou sangue periférico num subgrupo de doentes com leucemia mieloide aguda (LMA) diagnosticados com citomorfologia M3 e translocação t(15;17)(q22;q21) com um ponto de quebra no intrão 6 do gene PML. Os resultados obtidos destinam-se a ajudar a monitorizar a eficácia do tratamento em doentes sujeitos a terapia e ao acompanhamento da doença residual mínima (DRM) para monitorizar a recaída.

## Resumo e explicação

Os transcritos do gene de fusão (GF) PML-RARA, que são o resultado molecular da translocação t(15;17)(q22;q21), estão associados à maior parte dos casos de leucemia progranulocítica aguda (LPA) (>90%), um subconjunto distinto de LMA com citomorfologia M3, que é responsável por 10–15% de todos os casos de LMA. A translocação t(15;17) recíproca equilibrada leva à fusão do gene da leucemia promielocítica (PML) para o recetor alfa do ácido retinoico (RARA) para criar a proteína de fusão PML-RARA. A proteína quimérica PML-RARA é um repressor transcricional. A sua expressão está associada a diferenciação mieloide afetada, devido à afinidade crescente com o complexo proteico nuclear repressor (NcoR), a alteração da estrutura da cromatina por histona deacetilase (HDAC) e inibição da transcrição. O tratamento com ácido todo transretinoico (ATRA) é altamente eficaz em LPA e funciona como um agente de diferenciação ao promover a libertação do complexo NcoR/HDAC, restaurando, desta forma, a transcrição normal.

Os pontos de quebra RARA ocorrem sempre no intrão 2. Dependendo da localização dos pontos de quebra no local da PML, podem formar-se o intrão 6, o exão 6 e o intrão 3, nos respectivos subtipos de transcrito PML-RARA designados por longo (L ou bcr1), variante (V ou bcr2) e curto (S ou bcr3) (figura 1). Estes subtipos de transcrito representam 55%, 5%, e 40% dos casos, respetivamente.



**Figura 1: Diagrama esquemático da transcrição do gene de fusão PML-RARA coberto pelos primers EAC qPCR e conjunto da sonda. Para o tipo bcr1 (L): ENF903–ENP942–ENR962. Para o tipo bcr2 (V): ENF906–ENP942–ENR962. Para o tipo bcr3 (S): ENF905–ENP942–ENR962. O número sob os primers e sonda diz respeito à posição de cada tipo de transcrição do GF entre as variantes PML-RARA.**

---

Um tratamento combinado com quimioterapia à base de antraciclina e ATRA tem uma elevada taxa de sucesso na LPA, oferecendo remissões duradouras e cura provável em até 70% dos doentes recém-diagnosticados. Contudo, as taxas de recaída e baixa sobrevivência ainda se verificam em 15–25% dos doentes. A deteção do gene de fusão PML-RARA único por reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) qualitativa convencional tem sido amplamente usada para diagnóstico rápido e previsão da resposta a terapias. Contudo, esta técnica apresenta desvantagens e a sua sensibilidade é relativamente baixa.

A quantificação do número de cópias PML-RARA por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) apresenta várias vantagens. É uma técnica altamente sensível e reproduzível, que também permite uma avaliação da cinética. A análise do valor prognóstico de um protocolo qPCR normalizado bem estabelecido (Programa EAC) em doentes com LPA durante várias fases do tratamento indicou que esta abordagem é uma alternativa robusta para avaliar a DRM e que se pode estabelecer uma estratificação do risco de recaída com base no número de cópias normalizadas de PML-RARA. Durante a análise de pós-consolidação, o ensaio qPCR positivo pode dar uma boa previsão da recaída hematológica subsequente. Durante a terapia de manutenção, e para além do fim do tratamento, um teste qPCR positivo é associado a um maior risco de recaída e a uma taxa de sobrevivência menor. A estratificação do risco de recaída com base na quantificação do número de cópias normalizadas (NCN) de PML-RARA divide os doentes em 3 grupos: os com grande risco de recaída, os com um risco de recaída intermédio e os com um baixo risco de recaída (1). A monitorização do PML-RARA através da deteção sensível do transcrito é encarada como uma parte integrante da estratégia global de tratamento na LPA (ver referências 2 e 3 para mais detalhes), sendo o tipo de tratamento e a intensidade do tratamento modulados em doentes com riscos diferentes de recaída durante o acompanhamento.

A normalização e a validação do método de quantificação da DRM foram estabelecidas num projeto multicêntrico conduzido pela EAC e publicado em 2003 (4, 5). O kit *ipsogen* PML-RARA bcr1 baseia-se nesta técnica.

# Princípio do procedimento

A técnica de qPCR permite a quantificação exata de produtos de PCR durante a fase exponencial do processo de amplificação da PCR. Além disso, os dados da PCR podem ser obtidos rapidamente sem processamento pós-PCR, através de detecção em tempo real de sinais de fluorescência durante e/ou após o ciclo da PCR, reduzindo, assim, drasticamente, o risco de contaminação do produto de PCR. Atualmente, estão disponíveis 3 tipos principais de técnicas de qPCR: A análise de qPCR usando corante SYBR® Green I, a análise de qPCR usando sondas de hidrólise e a análise de qPCR usando sondas de hibridação.

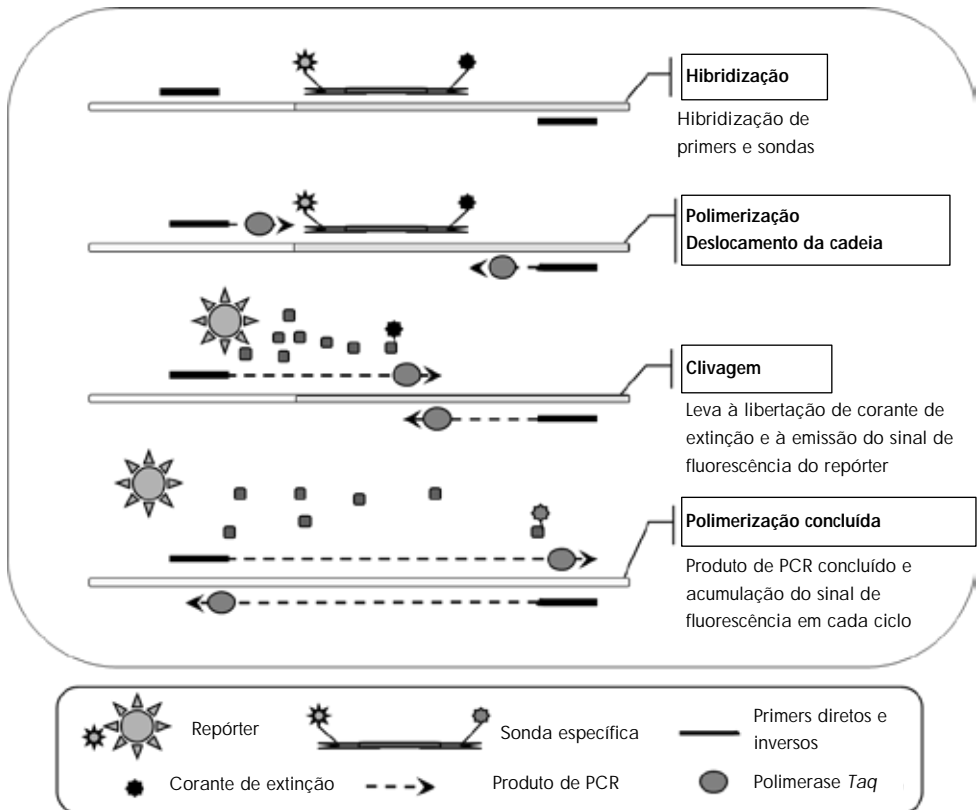
Este ensaio explora o princípio de hidrólise de oligonucleótido de duplo corante por qPCR. Durante a PCR, os primers diretos e inversos hibridam-se numa sequência específica. Um oligonucleótido de duplo corante está contido na mesma mistura. Esta sonda, que consiste num oligonucleótido rotulado com um corante repórter 5' e um corante de extinção 3' a jusante, hibrida-se para uma sequência alvo dentro do produto de PCR. A análise qPCR com sondas de hidrólise explora a atividade de exonuclease 5' à 3' da *Taq* (*Thermus aquaticus*) ADN-polimerase. Quanto a sonda está intacta, a proximidade do corante repórter em relação ao corante de extinção resulta na supressão da fluorescência do repórter, principalmente através de transferência de energia do tipo Förster.

Durante a PCR, se o alvo de interesse estiver presente, a sonda hibrida-se especificamente entre os locais de primer direto e inverso. A atividade de exonuclease 5' à 3' da ADN-polimerase faz a clivagem da sonda entre o corante repórter e o de extinção somente se a sonda se hibridar com o alvo. Os fragmentos da sonda são, depois, deslocados do alvo, continuando a polimerização da cadeia. A extremidade 3' da sonda é bloqueada para prevenir a extensão da sonda durante a PCR (figura 2). Este processo ocorre em cada ciclo e não interfere com a acumulação exponencial de produto.

---

O aumento do sinal de fluorescência é detetado apenas se a sequência alvo for complementar à sonda e, por conseguinte, for amplificada durante a PCR. Devido a estes requisitos, a amplificação não específica não é detetada. Por conseguinte, o aumento da fluorescência é diretamente proporcional à amplificação do alvo durante a PCR.





**Figura 2: Princípio de reação.** O ARN total é transcrito reversamente e o ADNc gerado é amplificado por PCR usando um par de primers específicos e uma sonda de duplo corante interna específica (FAM™–TAMRA™). A sonda liga-se ao amplicon durante cada passo de hibridização da PCR. Quando a Taq se estende da ligação do primer para o amplicon, desloca a extremidade 5' da sonda, que é então degradada pela atividade de exonuclease 5' à 3' da Taq ADN-polimerase. A clivagem continua até a sonda restante fundir o amplicon. Este processo libera o fluoróforo e o corante de extinção para dentro da solução, separando-os espacialmente e provocando um aumento de fluorescência da FAM e um decréscimo da fluorescência da TAMRA.

# Materiais fornecidos

## Conteúdo do kit

<b><i>ipsogen PML-RARA bcr1 Kit</i></b>		<b>(24)</b>
<b>N.º de catálogo</b>		<b>672123</b>
<b>Número de reações</b>		<b>24</b>
<b>Componente</b>	<b>Nome</b>	<b>Quantidade</b>
ABL Control Gene Standard Dilution (diluição do padrão do gene de controlo ABL) ( $10^3$ cópias/5 $\mu$ l)	C1-ABL	50 $\mu$ l
ABL Control Gene Standard Dilution (diluição do padrão do gene de controlo ABL) ( $10^4$ cópias/5 $\mu$ l)	C2-ABL	50 $\mu$ l
ABL Control Gene Standard Dilution (diluição do padrão do gene de controlo ABL) ( $10^5$ cópias/5 $\mu$ l)	C3-ABL	50 $\mu$ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (diluição do padrão do gene de fusão PML-RARA bcr1) ( $10^1$ cópias/5 $\mu$ l)	F1-PML-RARA bcr1	50 $\mu$ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (diluição do padrão do gene de fusão PML-RARA bcr1) ( $10^2$ cópias/5 $\mu$ l)	F2-PML-RARA bcr1	50 $\mu$ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (diluição do padrão do gene de fusão PML-RARA bcr1) ( $10^3$ cópias/5 $\mu$ l)	F3-PML-RARA bcr1	50 $\mu$ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (diluição do padrão do gene de fusão PML-RARA bcr1) ( $10^5$ cópias/5 $\mu$ l)	F4-PML-RARA bcr1	50 $\mu$ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (diluição do padrão do gene de fusão PML-RARA bcr1) ( $10^6$ cópias/5 $\mu$ l)	F5-PML-RARA bcr1	50 $\mu$ l
Primers and Probe Mix ABL* (primers e mistura de sondas ABL)	PPC-ABL 25x	90 $\mu$ l
Primers and Probe Mix PML-RARA bcr1 Fusion Gene† (primers e mistura de sondas PML-RARA, gene de fusão bcr1)	PPF-PML-RARA bcr1 25x	110 $\mu$ l
<i>ipsogen PML-RARA bcr1 Kit Handbook</i> (inglês)		1

\* Mistura de primers diretos e inversos específicos para o gene de controlo ABL mais uma sonda FAM-TAMRA específica.

† Mistura de primers diretos e inversos específicos para o gene de fusão PML-RARA bcr1 mais uma sonda específica FAM-TAMRA.

**Nota:** antes de os usar, centrifugue, por instantes, as diluições do padrão, bem como os primers e as misturas de sondas.

## Materiais necessários, mas não fornecidos

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (SDSs) disponibilizadas pelo distribuidor do produto.

Assegure-se de que os instrumentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

### Reagentes

- I Água para uso em PCR sem nuclease
- I Reagentes para transcrição reversa: O reagente validado é SuperScript® II (ou SuperScript) Reverse Transcriptase, inclui 5x tampão de primeira cadeia e 100 mM DTT (Life Technologies, cat. n.º 18064-022)
- I Inibidor de RNase: O reagente validado é RNaseOUT™ (Life Technologies, cat. n.º 10777-019)
- I Conjunto de dNTPs, grau PCR
- I Hexâmero aleatório
- I MgCl<sub>2</sub>
- I Tampão e *Taq* ADN-polimerase: Os reagentes validados são TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, cat. n.º 4304437) e LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, cat. n.º 04535286001)

## Consumíveis

- I Pontas de pipetas de PCR, estéreis, sem nuclease e resistentes a aerossóis com filtros hidrófobos
- I Tubos de PCR de 0,5 ml ou 0,2 ml sem RNase e sem DNase
- I Gelo

## Equipamento

- I Pipeta microlitro\* dedicadas para PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- I Centrífuga de bancada\* com rotor para tubos de ensaio de 0,2 ml/0,5 ml (com uma velocidade máxima de 13 000/14 000 rpm)
- I Instrumento de PCR em tempo real:\* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ou outros instrumentos RotorGene Q; LightCycler 1.2, 2.0 ou 480; ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; ou SmartCycler; e material específico associado
- I Termociclador\* ou banho-maria\* (passo de transcrição reversa)

## Reagentes complementares

- I Kit de controlos *ipsogen* PML-RARA bcr1 (n.º de cat. 672091), destinado apenas a ser utilizado em investigação, consistindo em linhas de células com expressão negativa, alta e positiva baixa do gene de fusão PML-RARA bcr1 para a validação qualitativa da extração do ARN e da transcrição reversa

---

# Avisos e precauções

Para utilização em diagnóstico in vitro

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (SDSs). Estas estão disponíveis online em formato PDF, cómodo e compacto, no endereço [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), onde poderá encontrar, visualizar e imprimir as SDSs para cada kit da QIAGEN e respetivos componentes.

Elimine as amostras e os resíduos do ensaio de acordo com os regulamentos de segurança locais.

## Precauções gerais

A utilização de testes de qPCR requer boas práticas laboratoriais (incluindo a manutenção do equipamento) dedicadas a biologia molecular e em conformidade com os regulamentos aplicáveis e as normas correspondentes.

Este kit destina-se à utilização em diagnóstico in vitro. Os reagentes e as instruções fornecidos neste kit foram validados para um desempenho ideal. A diluição adicional dos reagentes ou a alteração dos tempos e temperaturas de incubação podem dar origem a dados erróneos ou discordantes. Os reagentes PPC e PPF podem ser alterados se expostos à luz. Todos os reagentes são formulados especificamente para utilização com este teste. Para um desempenho ideal do teste não se devem realizar substituições.

Para determinar os níveis de transcrito com qPCR, são necessárias a transcrição reversa do mRNA e a amplificação do ADNc gerado pela PCR. Por isso, todo o procedimento de ensaio tem de ser realizado sem RNase/DNase.

---

Tenha um cuidado extremo para prevenir:

- I Contaminações com RNase/DNase que podem provocar a degradação do modelo de mRNA e do ADNc gerado
- I Contaminação por transporte com mRNA ou PCR, provocando um sinal falso positivo

Por conseguinte, recomendamos o seguinte:

- I Utilização de material de laboratório sem nuclease (p. ex., pontas de pipetas, frascos-ampola de reação) e de luvas durante a realização do ensaio.
- I Utilização de pontas de pipetas novas e resistentes a aerossóis em todas as fases de pipetagem, para evitar a contaminação cruzada das amostras e dos reagentes.
- I Preparação da pré-mistura principal de pré-PCR com material dedicado (pipetas, pontas, etc.) numa área dedicada onde não sejam introduzidas matrizes de ADN (ADNc, ADN, plasmídeos). Adição do modelo numa zona separada (preferencialmente numa sala em separado) com material específico (pipetas, pontas, etc.).
- I Manuseamento das diluições do padrão (C1–3 e F1–5) numa sala em separado.

---

# Armazenamento e manuseamento de reagente

Os kits são expedidos em gelo seco e devem ser guardados entre  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  após a receção.

- I Minimizar a exposição à luz dos primers e das misturas de sondas (tubos PPC e PPF).
- I Misturar e centrifugar cuidadosamente os tubos antes de os abrir.
- I Conservar todos os componentes do kit nas embalagens originais.

Estas condições de conservação aplicam-se tanto a componentes abertos como fechados. Os componentes conservados noutras condições que não as indicadas nos rótulos podem não apresentar um desempenho apropriado e afetar negativamente os resultados do ensaio.

As datas de validade de cada reagente estão indicadas nos rótulos dos componentes individuais. O produto manterá o seu desempenho até à data de validade impressa no rótulo, desde que mantido nas condições de conservação corretas.

Não existem sinais óbvios para indicar a instabilidade deste produto. No entanto, controlos positivos e negativos devem ser executados simultaneamente com amostras desconhecidas.

# Procedimento

## Preparação da amostra de ARN

A preparação de ARN a partir de amostras de doentes (sangue ou medula óssea) deverá ter sido realizada segundo um procedimento validado. A qualidade do ensaio depende largamente da qualidade do ARN de entrada. Por isso, recomendamos a qualificação de ARN purificado por eletroforese de gel de agarose\* ou bioanalisador Agilent® Bioanalyzer® antes da análise.

## Protocolo: transcrição reversa EAC normalizada recomendada

### Passos a seguir antes de começar

- I Prepare dNTPs, 10 mM cada. Guarde a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  em alíquotas.
- I Prepare hexâmero aleatório, 100  $\mu\text{M}$ . Guarde a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  em alíquotas.
- I Prepare  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM. Guarde a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  em alíquotas.

### Procedimento

1. Descongele todos os componentes necessários e coloque-os no gelo.
2. Incube 1  $\mu\text{g}$  de ARN (1–4  $\mu\text{l}$ ) durante 10 minutos a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  e arrefeça imediatamente em gelo durante 5 minutos.
3. Centrifugue por instantes (aproximadamente 10 segundos, 10 000 rpm) para recolher o líquido no fundo do tubo. Mantenha no gelo.
4. Prepare a mistura RT seguinte de acordo com o número de amostras a processar (tabela 1).

\* Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção.



**Tabela 1: Preparação da mistura RT**

Componente	Volume por amostra ( $\mu\text{l}$ )	Concentração final
Tampão de primeira cadeia (fornecido com SuperScript II Reverse Transcriptase), 5x	4,0	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,0	5 mM
dNTPs (10 mM cada, a preparar previamente e guardados a -20 °C em alíquotas)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, fornecido com SuperScript II Reverse Transcriptase)	2,0	10 mM
Inibidor de RNase (40 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5	1 U/ $\mu\text{l}$
Inibidor de RNase (40 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5	1 U/ $\mu\text{l}$
Hexâmero aleatório (100 $\mu\text{M}$ )	5,0	25 $\mu\text{M}$
SuperScript II ou SuperScript Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5	5 U/ $\mu\text{l}$
Amostra de ARN aquecida (a acrescentar no passo 5)	1,0–4,0	50 ng/ $\mu\text{l}$
Água para uso em PCR sem nuclease (a acrescentar no passo 5)	0,0–3,0	–
Volume final	20,0	–

5. Pipete 16  $\mu\text{l}$  de mistura RT em cada tubo de PCR. Depois adicione 1–4  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}$ ) de ARN (do passo 3) e ajuste o volume para 20  $\mu\text{l}$  com água para uso em PCR sem nuclease (ver tabela 2).

**Tabela 2: Preparação da reação de transcrição reversa**

<b>Componente</b>	<b>Volume (µl)</b>
Mistura RT	16
Amostra de ARN aquecida (1 µg)	1–4
Água para uso em PCR sem nuclease	0–3
Volume final	20

6. Misture bem e centrifugue por instantes (aproximadamente 10 segundos, 10 000 rpm) para recolher o líquido no fundo do tubo.
7. Incube a 20 °C durante 10 minutos.
8. Incube a 42 °C num termociclador durante 45 minutos, depois imediatamente a 99 °C durante 3 minutos.
9. Arrefeça em gelo (para parar a reação) durante 5 minutos.
10. Centrifugue por instantes (aproximadamente 10 segundos, 10 000 rpm) para recolher o líquido no fundo do tubo. Mantenha no gelo.
11. Dilua o ADNc final com 30 µl de água para uso em PCR sem nuclease, de forma a que o volume final seja de 50 µl.
12. Realize a PCR de acordo com os seguintes protocolos, segundo o seu instrumento qPCR.

## Protocolo: qPCR em instrumentos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ou Rotor-Gene Q 5plex HRM com rotor de 72 tubos

Usando este instrumento, recomendamos a realização de todas as medições em duplicado, conforme indicado na tabela 3.

**Tabela 3: Número de reações para instrumentos Rotor-Gene Q com rotor de 72 tubos**

<b>Amostras</b>	<b>Reações</b>
<b>Com os primers e misturas de sondas ABL (PPC-ABL)</b>	
n amostras de ADNc	n x 2 reações
Padrão ABL	2 x 3 reações (3 diluições, cada uma testada em duplicado)
Controlo de água	2 reações
<b>Com os primers e mistura de sondas PML-RARA bcr1 (PPF-PML-RARA bcr1)</b>	
n amostras de ADNc	n x 2 reações
Padrão PML-RARA	2 x 5 reações (5 diluições, cada uma testada em duplicado)
Controlo de água	2 reações

Processamento de amostras em instrumentos Rotor-Gene® Q com rotor de 72 tubos

Recomendamos o teste de, pelo menos, 8 amostras de ADNc no mesmo ensaio para otimizar a utilização de padrões, de primers e misturas de sondas.

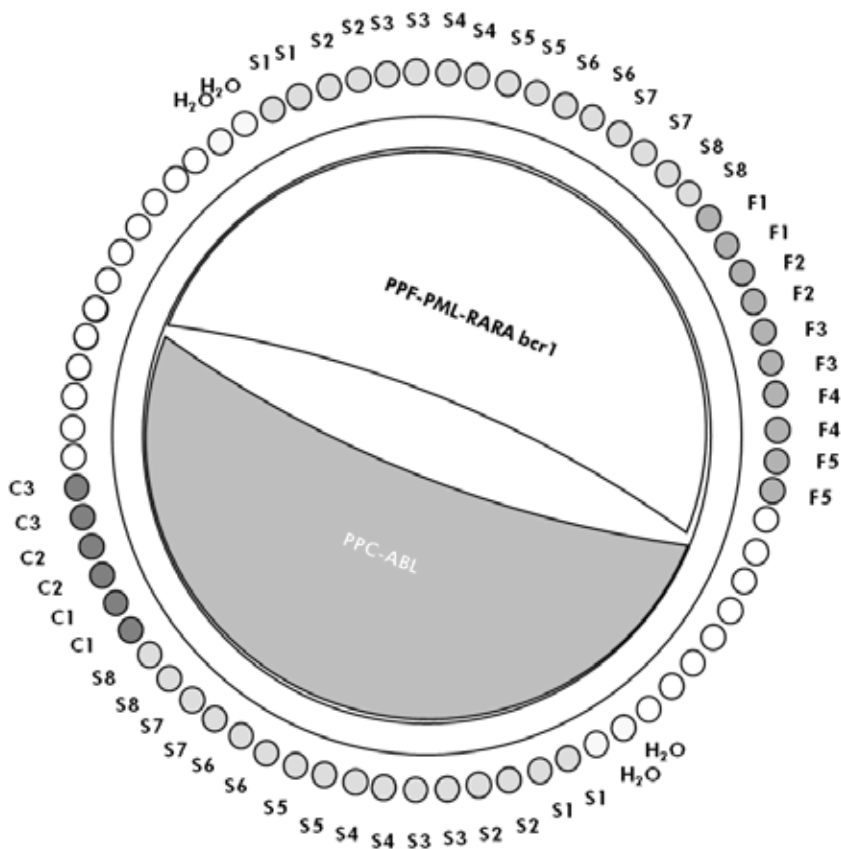


Figura 3: Configuração sugerida para rotor para cada ensaio com o kit *ipsogen* PML-RARA bcr1. F1-5: Padrões PML-RARA bcr1; C1-3: Padrões ABL; S: Amostra de ADNc; H<sub>2</sub>O: controle de água.

**Nota:** Tenha o cuidado de colocar sempre uma amostra a ser testada na posição 1 do rotor. Caso contrário, durante a fase de calibragem, o instrumento não realizará a calibragem e podem ser adquiridos dados de fluorescência incorretos.

Preencha todas as outras posições com tubos vazios.

## qPCR em instrumentos Rotor-Gene Q com rotor de 72 tubos

**Nota:** Realizar todos os passos no gelo.

### Procedimento

1. Descongele todos os componentes necessários e coloque-os no gelo.
2. Prepare a seguinte mistura de qPCR de acordo com o número de amostras a processar.

Todas as concentrações são o volume final da reação.

A tabela 4 descreve o esquema de pipetagem para a preparação de uma mistura de reagentes, calculada para alcançar um volume de reação final de 25 µl. Pode ser preparada uma pré-mistura de acordo com o número de reações, usando os mesmos primers e mistura de sondas (PPC-ABL ou PPF-PML-RARA bcr1). São incluídos volumes extra para compensar erros de pipetagem.

**Tabela 4: Preparação da mistura de qPCR**

<b>Componente</b>	<b>1 reação (µl)</b>	<b>ABL: 24 + 1 reações (µl)</b>	<b>PML-RARA bcr1: 28 + 1 reações (µl)</b>	<b>Concentração final</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primers e mistura de sondas, 25x	1	25	29	1x
Água para uso em PCR sem nuclease	6,5	162,5	188,5	–
Amostra (a acrescentar ao passo 4)	5	5 cada	5 cada	–
Volume total	25	25 cada	25 cada	–

3. Distribua 20 µl da pré-mistura qPCR por tubo.
4. Adicione 5 µl do produto RT (ADNc, 100 ng, ARN equivalente) obtido na transcrição reversa (ver “Protocolo: transcrição reversa EAC normalizada recomendada”, página 16) no tubo correspondente (volume total 25 µl).
5. Misture cuidadosamente, pipetando para cima e para baixo.
6. Coloque os tubos no termociclador de acordo com as recomendações do fabricante.
7. Programe o instrumento Rotor-Gene Q com o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 5.

**Tabela 5: Perfil de temperatura**

<b>Modo de análise</b>	<b>Quantificação</b>
<b>Manter</b>	Temperatura: 50 graus Tempo: 2 min
<b>Manter 2</b>	Temperatura: 95 graus Tempo: 10 min
<b>Ciclagem</b>	50 vezes 95 graus durante 15 segundos 60 graus durante 1 minuto com aquisição de fluorescência da FAM em Channel Green: Single (simples)

8. Inicie o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 5.
9. Para instrumentos Rotor-Gene Q, selecione “Slope Correct” (Correção de declive) para a análise. Recomendamos que o limiar seja definido para 0,03.

Protocolo: qPCR em ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System e instrumento LightCycler 480

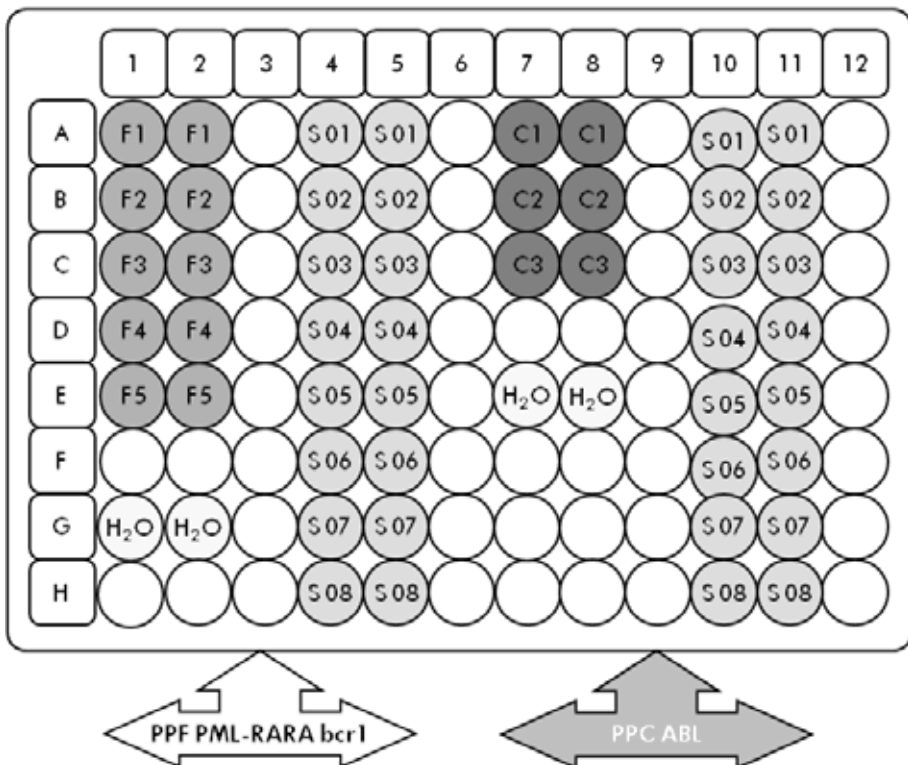
Usando equipamento de qPCR de placas de 96 poços, recomendamos a realização de todas as medições em duplicado, conforme indicado na tabela 6.

**Tabela 6: Número de reações usando equipamento de qPCR de placas de 96 poços**

<b>Amostras</b>	<b>Reações</b>
<b>Com os primers e misturas de sondas ABL (PPC-ABL)</b>	
n amostras de ADNc	n x 2 reações
Padrão ABL	2 x 3 reações (3 diluições, cada uma testada em duplicado)
Controlo de água	2 reações
<b>Com os primers e mistura de sondas PML-RARA bcr1 (PPF-PML-RARA bcr1)</b>	
n amostras de ADNc	n x 2 reações
Padrão PML-RARA bcr1	2 x 5 reações (5 diluições, cada uma testada em duplicado)
Controlo de água	2 reações

Processamento de amostras em ABI PRISM 7000, 7700 e 7900 SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System e instrumentos LightCycler 480

Recomendamos o teste de, pelo menos, 8 amostras de ADNc no mesmo ensaio para otimizar a utilização de padrões, de primers e misturas de sondas. O esquema de placas na figura 4 apresenta um exemplo de um ensaio deste tipo.



**Figura 4: Configuração da placa sugerida para um ensaio.** S: Amostra de ADNc; F1-5: Padrões PML-RARA bcr1; C1-3: Padrões ABL; H<sub>2</sub>O: controlo de água.

qPCR em ABI PRISM 7000, 7700 e 7900 SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System e instrumentos LightCycler 480

**Nota:** Realizar todos os passos no gelo.



## Procedimento

1. Descongele todos os componentes necessários e coloque-os no gelo.
2. Prepare a seguinte mistura de qPCR de acordo com o número de amostras a processar.  
Todas as concentrações são o volume final da reação.

A tabela 7 descreve o esquema de pipetagem para a preparação de uma mistura de reagentes, calculada para alcançar um volume de reação final de 25 µl. Pode ser preparada uma pré-mistura de acordo com o número de reações, usando os mesmos primers e mistura de sondas (PPC-ABL ou PPF-PML-RARA bcr1). São incluídos volumes extra para compensar erros de pipetagem.

**Tabela 7: Preparação da mistura de qPCR**

Componente	1 reação (µl)	ABL: 24 +1 reações (µl)	PML-RARA bcr1: 28 +1 reações (µl)	Concentração final
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Primers e mistura de sondas, 25x	1	25	29	1x
Água para uso em PCR sem nuclease	6,5	162,5	188,5	–
Amostra (a acrescentar ao passo 4)	5	5 cada	5 cada	–
Volume total	25	25 cada	25 cada	–

3. Distribua 20 µl da pré-mistura qPCR por poço.
4. Adicione 5 µl do produto RT (ADNc, 100 ng, ARN equivalente) obtido na transcrição reversa (ver “Protocolo: transcrição reversa EAC normalizada recomendada”, página 16) no poço correspondente (volume total 25 µl).

5. Misture cuidadosamente, pipetando para cima e para baixo.
6. Feche a placa e centrifugue brevemente (300 x *g*, aproximadamente 10 segundos).
7. Coloque a placa no termociclador de acordo com as recomendações do fabricante. Programe o termociclador com o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 8 para ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS e Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ou tabela 9 para o instrumento LightCycler 480.

**Tabela 8: Perfil de temperatura para ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS e Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System**

<b>Modo de análise</b>	Curvas-padrão — Quantificação absoluta
<b>Manter</b>	Temperatura: 50°C Tempo: 2 min
<b>Manter 2</b>	Temperatura: 95 °C Tempo: 10 min
<b>Ciclagem</b>	50 vezes 95 °C durante 15 segundos 60 °C durante 1 minuto com aquisição de fluorescência da FAM; corante de extinção: TAMRA

**Tabela 9: Perfil de temperatura para o instrumento LightCycler 480**

<b>Modo de análise</b>	Quantificação absoluta ("Abs Quant")
<b>Formatos de detecção</b>	Selecione "Simple Probe" (amostra simples) na janela de formatos de detecção
<b>Manter</b>	Temperatura: 50 °C Tempo: 2 min
<b>Manter 2</b>	Temperatura: 95 °C Tempo: 10 min
<b>Ciclagem</b>	50 vezes 95 °C durante 15 segundos 60 °C durante 1 minuto com aquisição de fluorescência da FAM correspondendo a (483–533 nm) para LC versão 01 e (465–510 nm) LC versão 02

8. Para ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS e Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, siga o passo 8a. Para LightCycler 480, siga o passo 8b.
- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS e Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: Recomendamos que o limiar seja definido em 0,1 conforme descrito no protocolo EAC, no passo de análise, e uma linha de base definida entre os ciclos 3 e 15. Inicie o programa de ciclagem da forma indicada na tabela 8.
- 8b. LightCycler 480: Recomendamos um modo de análise do ponto de ajuste com um fundo a 2,0 e limiar a 2,0. Inicie o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 9.

## Protocolo: qPCR em instrumentos LightCycler 1.2 e 2.0

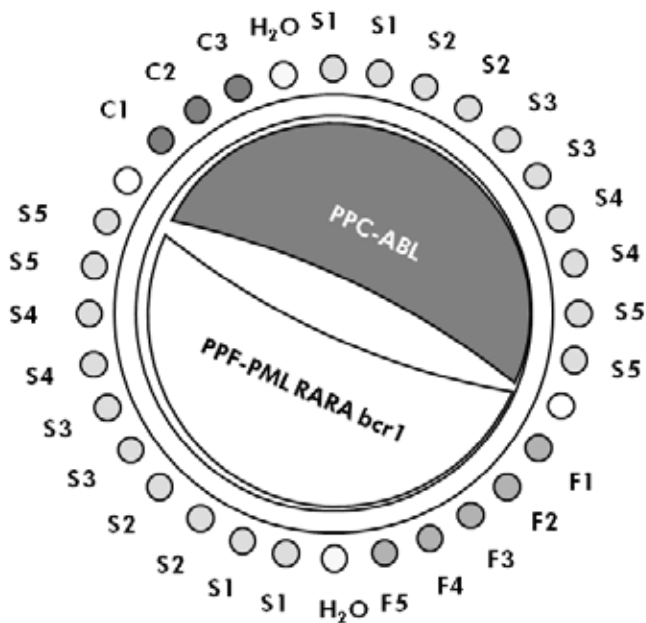
Utilizando instrumentos capilares, recomendamos a medição das amostras e dos controlos em duplicado apenas uma vez, conforme indicado na tabela 10.

**Tabela 10: Resultados de genotipagem segundo o cálculo  $\Delta\Delta CT$  para estudos não clínicos**  
Número de reações para instrumentos LightCycler 1.2 e 2.0

Amostras	Reações
<b>Com os primers e misturas de sondas ABL (PPC-ABL)</b>	
n amostras de ADNc	n x 2 reações
Padrão ABL	1 x 3 reações (3 diluições do padrão, cada uma testada uma vez)
Controlo de água	1 reação
<b>Com os primers e mistura de sondas PML-RARA bcr1 (PPF-PML-RARA bcr1)</b>	
n amostras de ADNc	n x 2 reações
Padrão PML-RARA bcr1	1 x 5 reações (5 diluições do padrão, cada uma testada uma vez)
Controlo de água	1 reação

### Processamento de amostras em instrumentos LightCycler 1.2 e 2.0

Recomendamos o teste de, pelo menos, 5 amostras de ADNc no mesmo ensaio para otimizar a utilização de padrões, de primers e misturas de sondas. O esquema capilar na figura 5 apresenta o exemplo de um ensaio deste tipo.



**Figura 5. Configuração sugerida para rotor para cada ensaio com o kit *ipsogen* PML-RARA bcr1.** F1-5: Padrões PML-RARA bcr1; C1-3: Padrões ABL; S: amostra de ADN desconhecida a ser analisada; H<sub>2</sub>O: controlo de água.

qPCR nos instrumentos LightCycler 1.2 e 2.0

**Nota:** Devido aos requisitos tecnológicos particulares, os ensaios LightCycler têm de ser realizados usando reagentes específicos. Recomendamos a utilização do LightCycler TaqMan Master e a observação e seguimento das instruções do fabricante para a preparação da Master Mix 5x.

**Nota:** Realizar todos os passos no gelo.

## Procedimento

1. Descongele todos os componentes necessários e coloque-os no gelo.
2. Prepare a seguinte mistura de qPCR de acordo com o número de amostras a processar. Todas as concentrações são o volume final da reação.

A tabela 11 descreve o esquema de pipetagem para a preparação de uma mistura de reagentes, calculada para alcançar um volume de reação final de 20 µl. Pode ser preparada uma pré-mistura de acordo com o número de reações, usando os mesmos primers e mistura de sondas (PPC-ABL ou PPF-PML-RARA bcr1). São incluídos volumes extra para compensar erros de pipetagem.

**Tabela 11: Preparação da mistura de qPCR**

Componente	1 reação (µl)	ABL: 14 + 1 reações (µl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 reações (µl)	Concentração final
LightCycler TaqMan Master Mix, 5x recém-preparada	4,0	60	68,0	1x
Primers e mistura de sondas, 25x	0,8	12	13,6	1x
Água para uso em PCR sem nuclease	10,2	153	173,4	–
Amostra (a acrescentar ao passo 4)	5,0	5 cada	5,0 cada	–
Volume total	20,0	20 cada	20,0 cada	–

3. Distribua 15 µl da pré-mistura qPCR por capilar.
4. Adicione 5 µl do produto RT (ADNc, 100 ng, ARN equivalente) obtido na transcrição reversa (ver “Protocolo: transcrição reversa EAC normalizada recomendada”, página 16) no tubo correspondente (volume total 20 µl).

5. Misture cuidadosamente, pipetando para cima e para baixo.
6. Coloque os capilares nos adaptadores fornecidos com o aparelho e centrifugue por breves instantes (700 x g, aproximadamente 10 segundos).
7. Carregue os capilares no termociclador de acordo com as recomendações do fabricante.
8. Programe o instrumento LightCycler 1.2 ou 2.0 com o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 12.

**Tabela 12: Perfil de temperatura**

<b>Modo de análise</b>	<b>Quantificação</b>
<b>Manter</b>	Temperatura: 95 °C Tempo: 10 min Rampa: 20
<b>Ciclagem</b>	50 vezes 95 °C durante 10 segundos; rampa: 20 60°C durante 1 minuto; rampa: 20; com aquisição de fluorescência da FAM: Single (simples)
<b>Manter 2</b>	45 °C durante 1 minuto; rampa: 20

9. Para o LightCycler 1.2, siga o passo 9a. Para o LightCycler 2.0, siga o passo 9b.
  - 9a. LightCycler 1,2: são recomendados o F1/F2 e o modo "2<sup>nd</sup> derivative analysis" (2.º modo de análise derivativa). Inicie o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 12.
  - 9b. LightCycler 2.0: Recomendamos a utilização da análise automatizada (F''max) no software LightCycler 2.0, versão 4.0, para obter resultados reproduzíveis. Inicie o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 12.

## Protocolo: qPCR no instrumento SmartCycler

Utilizando este instrumento, recomendamos a medição das amostras e dos controlos em duplicado apenas uma vez, conforme indicado na tabela 13.

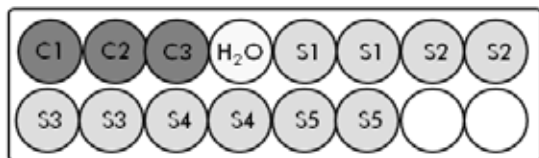
**Tabela 13: Resultados de genotipagem segundo o cálculo  $\Delta\Delta CT$  para estudos não clínicos**  
Número de reações para o instrumento SmartCycler

Amostras	Reações
<b>Com os primers e misturas de sondas ABL (PPC-ABL)</b>	
n amostras de ADNc	n x 2 reações
Padrão ABL	1 x 3 reações (3 diluições do padrão, cada uma testada uma vez)
Controlo de água	1 reação
<b>Com os primers e mistura de sondas PML-RARA bcr1 (PPF-PML-RARA bcr1)</b>	
n amostras de ADNc	n x 2 reações
Padrão PML-RARA bcr1	1 x 5 reações (5 diluições do padrão, cada uma testada uma vez)
Controlo de água	1 reação

### Processamento de amostras no instrumento SmartCycler

Recomendamos o teste de, pelo menos, 5 amostras de ADNc no mesmo ensaio para otimizar a utilização de padrões, de primers e misturas de sondas. O esquema de dois blocos na figure 6 apresenta um exemplo.





Todos os ensaios no primeiro bloco são realizados com PPC-ALB



Todos os ensaios neste segundo bloco são realizados com PPF-PML-RARA bcr1

**Figura 6: Configuração da placa sugerida para um ensaio.** S: Amostra de ADNc; F1–5: Padrões PML-RARA bcr1; C1–3: Padrões ABL; H<sub>2</sub>O: controlo de água.

qPCR no instrumento SmartCycler

**Nota:** Realizar todos os passos no gelo.

### Procedimento

1. Descongele todos os componentes necessários e coloque-os no gelo.
2. Prepare a seguinte mistura de qPCR de acordo com o número de amostras a processar. Todas as concentrações são o volume final da reação.

A tabela 14 descreve o esquema de pipetagem para a preparação de uma mistura de reagentes, calculada para alcançar um volume de reação final de 25 µl. Pode ser preparada uma pré-mistura de acordo com o número de reações, usando os mesmos primers e mistura de sondas (PPC-ABL ou PPF-PML-RARA bcr1). São incluídos volumes extra para compensar erros de pipetagem.

**Tabela 14: Preparação da mistura de qPCR**

<b>Componente</b>	<b>1 reação (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 14 + 1 reações (<math>\mu</math>l)</b>	<b>PML-RARA bcr1: 16 + 1 reações (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentração final</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Primers e mistura de sondas, 25x	1	15	17	1x
Água para uso em PCR sem nuclease	6,5	97,5	110,5	–
Amostra (a acrescentar ao passo 4)	5	5 cada	5 cada	–
Volume total	25	25 cada	25 cada	–

- Distribua 20  $\mu$ l da pré-mistura qPCR por poço.
- Adicione 5  $\mu$ l do produto RT (ADNc, 100 ng, ARN equivalente) obtido na transcrição reversa (ver “Protocolo: transcrição reversa EAC normalizada recomendada”, página 16) no tubo correspondente (volume total 25  $\mu$ l).
- Misture cuidadosamente, pipetando para cima e para baixo.
- Carregue as amostras no termociclador de acordo com as recomendações do fabricante.
- Programa o instrumento SmartCycler com o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 15.

**Tabela 15: Valores  $\Delta$ CT e dados de precisão para estudos não clínicos Perfil de temperatura**

<b>Manter</b>	Temperatura: 50 °C Tempo: 2 min
<b>Manter 2</b>	Temperatura: 95 °C Tempo: 10 min
<b>Ciclagem</b>	50 vezes 95 °C durante 15 segundos 60 °C durante 1 minuto com aquisição: Single (simples)

8. Recomendamos um limiar definido em 30. Inicie o programa de termociclagem da forma indicada na tabela 15.

# Interpretação dos resultados

## Princípio de análise de dados

Com a tecnologia TaqMan, o número de ciclos de PCR necessários para detetar um sinal acima do limiar é designado ciclo de limiar ( $C_T$ ) e é diretamente proporcional à quantidade de alvo presente no início da reação.

Utilizando padrões com um número conhecido de moléculas, é possível estabelecer uma curva-padrão e determinar a quantidade precisa de alvo presente na amostra de teste. As curvas-padrão *ipsogen* são baseadas em plasmídeo; usamos 3 diluições do padrão de plasmídeo para o gene de controlo (GC) ABL e 5 diluições do padrão para o gene de fusão (PML-RARA *bcr1*) para garantir curvas-padrão precisas. As figuras 7 e 8 mostram um exemplo das curvas de amplificação TaqMan obtidas com o kit *ipsogen* PML-RARA *bcr1*.

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

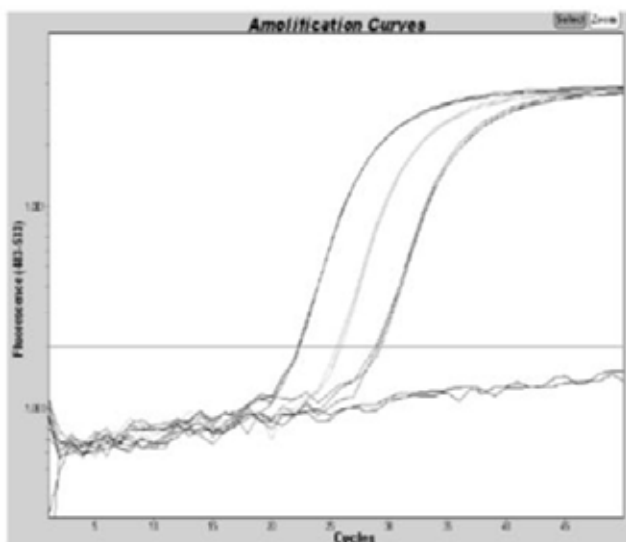


Figura 7: Detecção dos padrões ABL ( $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ).  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  cópias/5  $\mu$ l.

- PML-RARA bcr1 10<sup>1</sup>
- PML-RARA bcr1 10<sup>2</sup>
- PML-RARA bcr1 10<sup>3</sup>
- PML-RARA bcr1 10<sup>5</sup>
- PML-RARA bcr1 10<sup>6</sup>

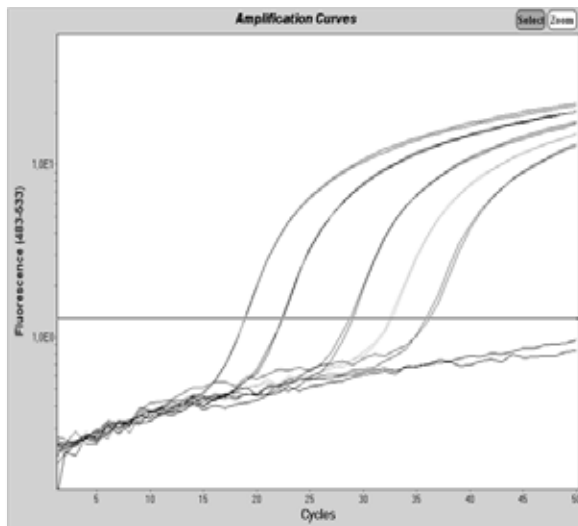


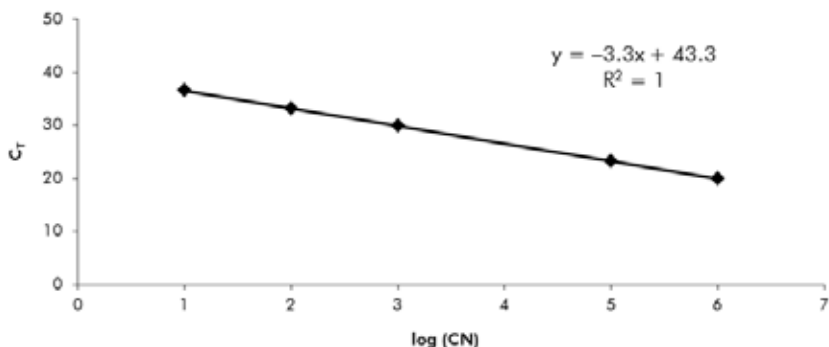
Figura 8: Detecção de padrões PML-RARA bcr1 (F1–F5). 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> cópias/5 µl.

## Results (Resultados)

### Curva-padrão e critérios de qualidade

Os dados em bruto podem ser colados para um ficheiro Excel<sup>®</sup> para análise.

Para cada gene (ABL e PML-RARA), os valores C<sub>T</sub> em bruto obtidos das diluições do padrão do plasmídeo são traçados segundo o número de cópia do registo (3, 4 e 5 para C1, C2 e C3; 1, 2, 3, 5 e 6 para F1, F2, F3, F4 e F5). A figura 9 apresenta um exemplo da curva teórica calculada em 5 diluições do padrão.



**Figura 9: Curva teórica calculada a partir de 5 diluições do padrão.** Uma curva de regressão linear ( $y = ax + b$ ) é calculada para cada gene (ABL e PML-RARA), sendo que  $a$  é o declive da linha e  $b$  é a intersecção  $y$ , que é a coordenada  $y$  do ponto em que a linha cruza o eixo  $y$ . A sua equação e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) são impressos no gráfico.

Como os padrões são diluições multiplicadas por dez, o declive teórico da curva é  $-3,3$ . Um declive entre  $-3,0$  e  $-3,9$  é aceitável desde que  $R^2$  seja  $>0,95$  (6). Contudo, é desejável um valor para  $R^2 >0,98$  para resultados precisos (7).

### Número de cópias normalizado (NCN)

A equação da curva-padrão ABL deve ser usada para transformar os valores  $C_T$  em bruto (obtidos com PPC-ABL) para as amostras desconhecidas em números de cópia ABL ( $ABL_{CN}$ ).

A equação da curva-padrão PML-RARA deve ser usada para transformar os valores  $C_T$  em bruto (obtidos com PPF-PML-RARA) para as amostras desconhecidas em números de cópias PML-RARA ( $PML-RARA_{CN}$ ).

O rácio destes valores CN resulta no número de cópias normalizado (NCN):

$$\text{NCN} = \frac{\text{PML-RARA}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}}$$

### Valor DRM

O valor da doença residual mínima (DRM) é o rácio entre a expressão normalizada GC de GF nas amostras de acompanhamento  $(\text{GF}_{\text{CN}}/\text{GC}_{\text{CN}})_{\text{FUP}}$  e nas amostras de diagnóstico  $(\text{GF}_{\text{CN}}/\text{GC}_{\text{CN}})_{\text{DX}}$ .

$$\text{Valor DRM (vDRM)} = \frac{(\text{GF}_{\text{CN}}/\text{GC}_{\text{CN}})_{\text{FUP}}}{(\text{GF}_{\text{CN}}/\text{GC}_{\text{CN}})_{\text{DX}}}$$

### Sensibilidade

A sensibilidade (SENSv) é calculada de acordo com a expressão relativa do gene de fusão na amostra de diagnóstico  $(\text{GF}_{\text{CN}}/\text{GC}_{\text{CN}})_{\text{DX}}$  e a expressão do gene de controlo  $(\text{GC}_{\text{CN,FUP}})$  na amostra de acompanhamento.

$$\text{Sensibilidade (SENSv)} = \frac{\text{GC}_{\text{CN,DX}}}{\text{GC}_{\text{CN,FUP}} \times \text{GF}_{\text{CN,DX}}}$$

### Controlo da qualidade nos valores ABL

Má qualidade do ARN ou problemas durante os passos qPCR resulta em  $\text{ABL}_{\text{CN}}$  baixo. Recomendamos que se descartem os resultados das amostras que derem  $\text{ABL}_{\text{CN}} < 1318$  (valor inferior do CI 95% de amostras de doentes no estudo EAC, referência 5).

## Reprodutibilidade entre replicados

A variação de valores  $C_T$  entre replicados deve ser  $<2$ , correspondendo a uma quadruplicação dos valores do número de cópias.

A variação dos valores  $C_T$  entre replicados é normalmente  $<1,5$  se o valor  $C_T$  médio dos replicados for  $<36$  (6).

**Nota:** Cada utilizador deve medir a sua própria reprodutibilidade no seu laboratório.

## Controlos da água

Os controlos negativos devem dar zero CN.

Um controlo de água positivo resulta de uma contaminação cruzada. Ver “Guia de resolução de problemas”, abaixo, para encontrar uma solução.



## Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para mais informações, consulte o seu coordenador clínico, ou visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

### Comentários e sugestões

---

#### Resultado negativo para o gene de controlo (ABL) e PML-RARA bcr1 em todas as amostras — padrão OK

- |                                              |                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Má qualidade do ARN                       | Verifique sempre a qualidade do ARN e a concentração antes de começar.<br>Corra um controlo ARN positivo da linha de células (kit de controlos <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1, cat. n.º 672091)* em paralelo. |
| b) Insucesso do passo de transcrição reversa | Verifique sempre a qualidade do ARN e a concentração antes de começar.<br>Corra um controlo ARN positivo da linha de células (kit de controlos <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1, cat. n.º 672091)* em paralelo. |

#### Resultado negativo para o gene de controlo (ABL) nas amostras — padrão OK

- |                                              |                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Má qualidade do ARN                       | Verifique sempre a qualidade do ARN e a concentração antes de começar.<br>Corra um controlo ARN positivo da linha de células (kit de controlos <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1, cat. n.º 672091)* em paralelo. |
| b) Insucesso do passo de transcrição reversa | Verifique sempre a qualidade do ARN e a concentração antes de começar.<br>Corra um controlo ARN positivo da linha de células (kit de controlos <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1, cat. n.º 672091)* em paralelo. |

## Comentários e sugestões

---

### Sinal do padrão negativo

- |                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Erro de pipetagem                                 | Verifique o esquema de pipetagem e a configuração da reação.<br>Repita a corrida da PCR.                                                                                                                                                                                                       |
| b) Armazenamento inapropriado dos componentes do kit | Guarde o kit <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 entre -15 e -30 °C e mantenha os primers e misturas de sondas (PPC e PPF) protegidos da luz. Ver “Armazenamento e manuseamento de reagente”, página 15.<br>Evite congelar e descongelar repetidamente.<br>Reagentes de alíquotas para armazenamento. |

### Os controlos negativos são positivos

Contaminação cruzada

Substitua todos os reagentes críticos.  
Repita o ensaio com alíquotas novas de todos os reagentes.  
As amostras, os componentes do kit e os consumíveis devem sempre ser tratados de acordo com as práticas normalmente aceites para prevenir a contaminação por transporte.

### Sem sinal, mesmo nos controlos-padrão

- |                                                                                          |                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Erro de pipetagem ou reagentes ausentes                                               | Verifique o esquema de pipetagem e a configuração da reação.<br>Repita a corrida da PCR. |
| b) Efeitos inibidores do material da amostra provocados por uma purificação insuficiente | Repita a preparação do ARN.                                                              |
| c) LightCycler: escolhido o canal de deteção incorreto                                   | Defina o canal para F1/F2 ou 530 nm/640 nm.                                              |

## Comentários e sugestões

- 
- |                                                   |                                                                                                                                                 |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| d) LightCycler: sem aquisição de dados programada | Verifique os programas de ciclo.<br>Selecione o modo de aquisição “single” (simples) no final de cada segmento de hibridização do programa PCR. |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### Sinal ausente ou baixo nas amostras, mas os controlos-padrão estão OK

- |                                                 |                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Qualidade de ARN fraca ou concentração baixa | Verifique sempre a qualidade do ARN e a concentração antes de começar.<br>Corra um controlo ARN positivo da linha de células (kit de controlos <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1, cat. n.º 672091)*) em paralelo. |
| b) Insucesso do passo de transcrição reversa    | Verifique sempre a qualidade do ARN e a concentração antes de começar.<br>Corra um controlo ARN positivo da linha de células (kit de controlos <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1, cat. n.º 672091)*) em paralelo. |

### Intensidade da fluorescência demasiado baixa

- |                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Armazenamento inapropriado dos componentes do kit | Guarde o kit <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 entre -15 e -30 °C e mantenha os primers e misturas de sondas (PPC e PPF) protegidos da luz. Ver “Armazenamento e manuseamento de reagente”, página 15.<br>Evite congelar e descongelar repetidamente.<br>Reagentes de alíquotas para armazenamento. |
| b) Quantidade inicial muito baixa de ARN alvo        | Aumente a quantidade da amostra de ARN.<br><b>Nota:</b> Dependendo do método de preparação de ARN selecionado, podem verificar-se efeitos inibidores.                                                                                                                                          |

### LightCycler: a intensidade de fluorescência varia

- |                      |                                                                                                                                 |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Erro de pipetagem | A variabilidade provocada pelo designado “erro de pipetagem” pode ser reduzida analisando dados no modo F1/F2 ou 530 nm/640 nm. |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## Comentários e sugestões

- 
- |                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| b) Centrifugação insuficiente dos capilares           | A mistura preparada de PCR pode continuar a estar no vaso superior do capilar ou poderá estar presa uma bolha de ar na extremidade do capilar.<br><br>Centrifugue sempre os capilares carregados com mistura de reação, conforme descrito no manual de funcionamento específico do instrumento. |
| c) A superfície externa da ponta do capilar está suja | Use sempre luvas quando manusear os capilares.                                                                                                                                                                                                                                                  |

### LightCycler: Erro da curva-padrão

Erro de pipetagem

A variabilidade provocada pelo designado “erro de pipetagem” pode ser reduzida analisando dados no modo F1/F2 ou 530 nm/640 nm.

\* O kit de controlos *ipsogen* PML-RARA bcr1, n.º de cat. 672091, destina-se apenas a ser utilizado em investigação. Não se destina a ser utilizado em procedimentos de diagnóstico. Nenhuma afirmação ou declaração tem como objetivo fornecer informações para diagnóstico, prevenção ou tratamento de uma doença.

## Controlo da qualidade

O controlo da qualidade de todo o kit foi realizado num instrumento LightCycler 480. Este kit é fabricado em conformidade com a norma ISO 13485:2003. São disponibilizados certificados de análise quando solicitados através de [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Limitações

Os utilizadores devem dispor de formação e estar familiarizados com esta tecnologia antes da utilização do dispositivo. Este kit deve ser utilizado observando as instruções constantes deste manual, em conjunto com um instrumento validado indicado em “Materiais necessários, mas não fornecidos”, página 11.

---

Quaisquer resultados de diagnóstico gerados têm de ser interpretados juntamente com outros resultados clínicos ou laboratoriais. É da responsabilidade do utilizador validar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos utilizados no seu laboratório, que não estejam abrangidos pelos estudos de desempenho da QIAGEN.

Deve prestar-se atenção aos prazos de validade impressos na caixa e nas etiquetas de todos os componentes. Não utilize componentes cujo prazo de validade tenha expirado.

**Nota:** O kit foi concebido segundo os estudos “A Europa contra o Cancro” (EAC) (4, 5). Deve ser utilizado observando as instruções constantes deste manual em combinação com reagentes e instrumentos validados. Qualquer outra utilização não indicada deste produto e/ou modificação dos componentes anulará qualquer responsabilidade da QIAGEN.

## Características de desempenho

### Estudos não clínicos

#### Materiais e métodos

Avaliação do desempenho realizada num ABI PRISM 7700 SDS, em combinação com reagentes listados em “Materiais necessários, mas não fornecidos”, página 11. Estudos de equivalência validaram a sua utilização nos seguintes instrumentos: ABI PRISM 7000 e 7900HT SDS, LightCycler 1.2 e 480, RotorGene 3000 e SmartCycler.

Os estudos não clínicos foram conduzidos para estabelecer o desempenho analítico do kit *ipsogen* PML-RARA bcr1. Estes estudos de laboratório não clínicos foram realizados em ARN total da linha de células NB4 diluído numa quantidade final constante de linha de células de ARN total MV4-11.

Para determinar a repetibilidade do ensaio, foram analisadas 5 concentrações diferentes de ARN total de NB4 (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg e 0,5 pg) diluídas em ARN total MV4-11, numa quantidade total final constante de 200 ng, em 5 replicados por corrida e em 4 corridas diferentes. As amostras com 5 pg e 0,5 pg de ARN NB4 em ARN MV4-11 eram demasiado baixas para dar resultados (figura 10).

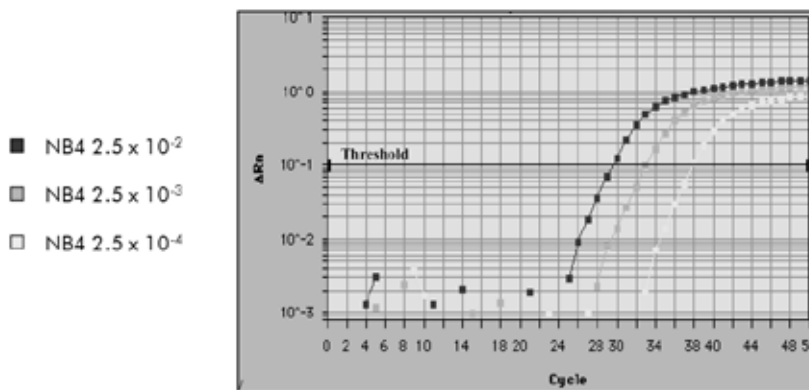


Figura 10: Gráficos de amplificação de  $2,5 \times 10^{-2}$  (5 ng),  $2,5 \times 10^{-3}$  (0,5 ng) e  $2,5 \times 10^{-4}$  (0,05 ng) de diluições de ARN total de NB4 em ARN total negativo MV4-11.

## Dados analíticos

As tabelas 16–19 mostram as análises inter-ensaio com o ciclo de limiar médio ( $C_T$ ), desvio padrão (SD), número de amostras (n), coeficiente de variação (CV), número médio de cópias (CN) e número médio de cópias normalizado (NCN).

**Tabela 16: Resultados de genotipagem segundo o cálculo  $\Delta\Delta CT$  para estudos não clínicos**  
**Análise inter-ensaio e intra-ensaio — linhas de células PML-RARA e ABL**

Linha de células	Diluição	Análise inter-ensaio				Análise intra-ensaio	
		C <sub>T</sub> médio	SD	n	CV (%)	Min. CV	Máx. CV
PML-RARA	5 ng	29,86	0,29	20	0,98	0,32	1,42
	0,5 ng	33,70	0,48	20	1,42	0,56	2,16
	0,05 ng	37,03	0,37	18	1,01	1,07	2,03
ABL	–	24,06	0,22	100	0,92	0,15	2,31

**Tabela 17: Análise inter-ensaio — plasmídeos**

Gene	Plasmídeo	C <sub>T</sub> médio	SD	n	CV (%)
PML-RARA	F1 (10 <sup>1</sup> cópias)	35,95	0,29	8	0,79
	F2 (10 <sup>2</sup> cópias)	32,25	0,59	8	1,84
	F3 (10 <sup>3</sup> cópias)	28,71	0,55	8	1,90
	F4 (10 <sup>5</sup> cópias)	22,14	0,49	7	2,23
	F5 (10 <sup>6</sup> cópias)	18,64	0,72	8	3,84
ABL	C1 (10 <sup>3</sup> cópias)	28,85	0,76	7	2,62
	C2 (10 <sup>4</sup> cópias)	25,25	0,71	8	2,82
	C3 (10 <sup>5</sup> cópias)	21,74	0,81	8	3,74

**Tabela 18: Análise inter-ensaio — linhas de células PML-RARA bcr1 e ABL (CN médio)**

Linha de células	Diluição	CN médio	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	2,5 x 10 <sup>-2</sup> (5 ng/200 µg)	583,95	149,19	20	25,55
	2,5 x 10 <sup>-3</sup> (0,5 ng/200 ng)	44,98	12,25	20	27,23
	2,5 x 10 <sup>-4</sup> (0,05 ng/200 ng)	4,91	1,55	19	31,52
ABL	–	35.171,47	22.448,3	99	63,83

**Tabela 19: Análise inter-ensaio — linha de células PML-RARA bcr1 (NCN médio)**

Linha de células	Diluição	NCN* médio	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	2,5 x 10 <sup>-2</sup> (5 ng/200 ng)	271,4	150,00	20	55,56
	2,5 x 10 <sup>-3</sup> (0,5 ng/200 ng)	15,35	8,12	20	52,87
	2,5 x 10 <sup>-4</sup> (0,05 ng/200 ng)	1,66	0,91	18	55,14
ABL	–	35.171,47	22.448,3	99	63,83

\* Apenas para estes resultados de estudo, o NCN é dado como  $\frac{\text{PML-RARA bcr1}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10\,000$ .

## Estudos clínicos

Avaliação do desempenho realizada num ABI PRISM 7700 SDS, em combinação com reagentes listados em “Materiais necessários, mas não fornecidos”, página 11. Estudos de equivalência validaram a sua utilização nos seguintes instrumentos: ABI PRISM 7000 e 7900HT SDS, LightCycler 1.2 e 480, RotorGene 3000 e SmartCycler.



Um grupo de 26 laboratórios em 10 países europeus, organizados numa ação concertada da EAC, usou plasmídeos fornecidos pela *ipsogen* para estabelecer um protocolo normalizado para a análise qPCR dos principais genes de fusão associados à leucemia no cenário clínico. O transcrito PML-RARA bcr1 foi um dos genes de fusão (GF) incluídos no estudo. Apresentamos aqui um sumário deste estudo de validação; os resultados completos foram publicados em 2003 (4, 5).

### Reprodutibilidade interlaboratorial para os padrões de plasmídeo GC e GF

Um total de 11 laboratórios realizaram uma experiência de reprodutibilidade interlaboratorial para avaliar a variabilidade na medição das diluições do padrão de plasmídeo GC e GF. As diluições foram realizadas em duplicado em cada instalação. A tabela 20 indica os desvios médio e padrão e o CV (%) para cada diluição.

**Tabela 20: Reprodutibilidade interlaboratorial para os padrões de plasmídeo GC e GF**

Gene	Diluição	Média	C <sub>T</sub> SD	CV (%)
Gene de controlo ABL	C1	29,26	0,69	2,31
	C2	25,79	0,65	2,53
	C3	22,40	0,61	2,70
Gene de fusão PML-RARA bcr1	F1	35,84	0,79	2,21
	F2	32,47	0,49	1,50
	F3	28,91	0,34	1,17
	F4	21,82	0,30	1,40
	F5	18,47	0,29	1,55

Valores de expressão da transcrição do gene de fusão PML-RARA bcr1

As tabelas 21 e 22 mostram os valores de expressão da transcrição do gene de fusão PML-RARA bcr1 e de GC ABL, para a linha de células NB4, doentes com LPA durante o diagnóstico e doentes de controlo negativo.

**Tabela 21: Resultados de genotipagem segundo o cálculo  $\Delta\Delta CT$  para estudos não clínicos**  
**Valores de expressão da transcrição do gene de fusão (GF) PML-RARA bcr1 e valores  $C_T$  do gene de controlo (GC) ABL**

	Valores $C_T$ (intervalo de 95%)	
	PML-RARA bcr1	ABL
<b>Linha de células NB4</b>	24,7	23,7
<b>Amostras de doentes com LPA</b>		
Medula óssea (n = 14)	25,6 (23,1–27,5)	24,5 (21,7–28,5)
Sangue periférico (n = 9)	25,7 (23,7–29,4)	24,6 (22,0–27,4)
<b>Amostras de doentes negativos</b>		
Medula óssea (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
Sangue periférico (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

Os valores  $C_T$  do ABL não diferiram significativamente entre as amostras normais e leucémicas, nem entre os tipos de amostra (PB ou BM) ou de amostras de leucemia de pacientes diagnosticados com LPA.

**Tabela 22: Resultados de genotipagem segundo o cálculo  $\Delta\Delta CT$  para estudos não clínicos. Valores de expressão da transcrição do gene de fusão (GF) PML-RARA bcr1 e valores CN e NCN do gene de controlo (GC) ABL**

	Valores CN (intervalo de 95%)		Valores NCN (intervalo de 95%)
	PML-RARA bcr1	ABL	CN bcr1/ CN ABL
<b>Amostras de doentes</b>			
Medula óssea (n = 14)	5129 (1480–25.704)	1538,7 (133,2–46.781,28)	0,30 (0,09–1,82)
Sangue periférico (n = 9)	3891 (475–14.454)	1400,76 (50,27–11.274)	0,36 (0,11–0,78)
<b>Amostras de doentes negativos</b>			
Medula óssea (n = 26)	–	19.201 (12.922–25.480)	–
Sangue periférico (n = 74)	–	21.136 (17.834–24.437)	–

### Taxas de falsos positivos e falsos negativos

As taxas de falsos positivos e falsos negativos foram computadas com os seguintes controlos.

- I Controlos positivos: Células NB4, uma linha de células bem conhecida pela sua positividade para o gene de fusão PML-RARA bcr1; amostras de doentes já avaliadas quanto a positividade PML-RARA bcr1
- I Controlos negativos: Amostras de ARN negativo, sem controlos de amplificação (NAC) feitas de ARN de *E. coli* em vez de ARN humano para verificar da existência de contaminação de PCR e controlos sem modelo (NTC) contendo água em vez de ARN humano

A amplificação em amostras de ARN do gene de fusão foi feita em triplicado e em duplicado para o GC.

Foi definida uma amostra falsa negativa como uma amostra de ARN positivo com menos de 50% de poços positivos (0/2, 0/3 ou 1/3).

Foi definida uma amostra falsa positiva como uma amostra negativa com menos de 50% de poços positivos (1/2, 2/3 ou 3/3).

A tabela 23 apresenta o número e a percentagem de amostras falsas negativas e falsas positivas.

**Tabela 23: Resultados de genotipagem segundo o cálculo  $\Delta\Delta CT$  para estudos não clínicos**  
Amostras falsas negativas e falsas positivas

Falsa negatividade		Falsa positividade	
$10^{-3}$	$10^{-4}$	Controlo GF negativo	NAC/NTC
0% (0/29)	0% (0/28)	11% (5/45)	5% (5/100)

---

## Referências

1. Santamarie, C. al. (2007) Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* **92**, 315.
2. Kern, W. et al. (2004) Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **112**, 4.**112**, 4.
3. Lo-Coco, F. and Ammantuna, E. (2006) The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology ASH Educ. Program* **514**, 156.
4. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.
5. Gabert, J. et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* **17**, 2318.
6. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
7. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **20**, 1925.

# Símbolos

Os símbolos seguintes podem aparecer na embalagem e na rotulagem:



<N>

Contém reagentes suficientes para <N> reações



Prazo de validade



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



Número de catálogo



Número do lote



Número do material (i.e., rotulagem do componente)



Número de Artigo para Comércio Global



Limites de temperatura



Fabricante



Consulte as instruções de utilização

### Histórico de revisões do documento

---

R5, Novembro de 2017

Foram adicionadas notas que referem que o Kit de controlos *ipsogen* PML-RARA bcr1, cat. n.º 672091, se destina a ser utilizado apenas para fins de investigação; foram corrigidos erros de datilografia pouco importantes.

# Informações para encomenda

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit (24)	Para 24 reações: Padrões de gene de controlo ABL, padrões de gene de fusão PML-RARA bcr1, primers e mistura de sondas ABL, primers e mistura de sondas do gene de fusão PML-RARA bcr1	672123
<b>Rotor-Gene Q MDx — para análise PCR em tempo real validada para IVD em aplicações clínicas</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra técnica; instalação e formação não incluídas.	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de melting com 5 canais (verde, amarelo, laranja, vermelho, carmim) mais canal HRM, computador portátil, software, acessórios, 1 ano de garantia em componentes e mão-de-obra técnica; instalação e formação incluídas.	9002033
<b><i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit — para a validação qualitativa da extração do ARN e a transcrição reversa do gene de fusão PML-RARA bcr1</b>		
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit	Linhas de células com expressão negativa, alta e positiva baixa do gene de fusão PML-RARA bcr1	672091*

\* O kit de controlos *ipsogen* PML-RARA bcr1, n.º de cat. 672091, destina-se apenas a ser utilizado em investigação. Não se destina a ser utilizado em procedimentos de diagnóstico. Nenhuma afirmação ou declaração tem como objetivo fornecer informações para diagnóstico, prevenção ou tratamento de uma doença.



---

Para informações atualizadas sobre licenciamento e limitações de responsabilidade específicas do produto, consulte o respectivo manual do kit QIAGEN ou do utilizador. Os manuais do kit QIAGEN e do utilizador estão disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou podem ser pedidos à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Este produto destina-se à utilização em diagnóstico *in vitro*. Os produtos *Ipsogen* não podem ser revendidos, modificados para revenda ou usados para o fabrico de produtos comerciais sem a aprovação expressa por escrito da QIAGEN.

A Informação constante do presente documento pode ser alterada sem aviso prévio. A QIAGEN não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros contidos no presente documento. Considera-se este documento como completo e rigoroso no momento da sua publicação. Em caso algum poderá a QIAGEN ser considerada responsável por danos accidentais, especiais, múltiplos ou consequenciais relacionados com ou decorrentes da utilização deste documento.

Garantimos que os produtos *Ipsogen* cumprem as especificações Indicadas. Caso os produtos não apresentem o desempenho garantido, a única obrigação da QIAGEN e a única compensação do cliente limitam-se à substituição dos produtos de forma gratuita.

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

#### Acordo de licenciamento limitado para o Kit *Ipsogen* PML-RARA bcr1

A utilização deste produto significa a aceitação, por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto, dos seguintes termos:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com o presente manual e recorrendo à utilização exclusiva de componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incluir os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual, e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Alguns dos referidos protocolos adicionais foram fornecidos por utilizadores QIAGEN para utilizadores QIAGEN. Os referidos protocolos não foram testados de forma exaustiva ou otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não assegura nem garante que os referidos protocolos não infringem os direitos de terceiros.
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não emite qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infringam os direitos de terceiros.
3. Este kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados ou ser objeto de revenda.
4. A QIAGEN recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e utilizador do kit concorda em não tomar nem permitir que qualquer outro tome medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições deste Acordo de Licença Limitada em qualquer tribunal e irá recuperar todos os seus custos legais e de investigação, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir este Acordo de Licença Limitada ou qualquer dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1358-005 1108718 Nov-2017 © 2013-2017 QIAGEN, todos os direitos reservados.

