

Manual do kit *ipsogen*[®] BCR-ABL1 MbcR IS-MMR



Versão 1

IVD

Diagnóstico *in vitro* quantitativo

Para usar com instrumentos Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®], ABI PRISM[®] e LightCycler[®]

CE

REF 670723



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALEMANHA

R3 **MAT** 1072509PT



QIAGEN Sample and Assay Technologies

A QIAGEN é o principal fornecedor de tecnologias inovadoras de amostragem e ensaio, permitindo o isolamento e a detecção do conteúdo de qualquer amostra biológica. Os avançados produtos e serviços de elevada qualidade da nossa empresa garantem o sucesso desde a amostra ao resultado.

A QIAGEN é uma empresa de referência em matéria de:

- Purificação de ADN, ARN e proteínas
- Ensaio de ácidos nucleicos e proteínas
- Investigação em microARN e ARNi
- Automatização de tecnologias de amostragem e ensaio

A nossa missão permitir-lhe-á alcançar o sucesso, bem como resultados notáveis. Para mais informações, visite **www.qiagen.com**.

Conteúdo

Utilização prevista	5
Resumo e explicação	5
Contextualização da LMC	5
Monitorização da doença	5
Princípio do procedimento	7
Materiais fornecidos	10
Conteúdo do kit	10
Materiais necessários, mas não fornecidos	11
Avisos e precauções	12
Precauções gerais	13
Armazenamento e manuseamento de reagente	13
Manuseamento e armazenamento de amostras	14
Procedimento	14
Preparação da amostra de ARN	14
Protocolos	
■ Transcriptase reversa com SuperScript III Reverse Transcriptase	15
■ qPCR em instrumentos Rotor Gene Q MDx 5plex HRM ou Rotor-Gene Q 5plex HRM com rotor de 72 tubos	18
■ qPCR em instrumentos Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS e LightCycler 480	22
■ qPCR nos instrumentos LightCycler 1.2, 1.5 e 2.0	28
Interpretação dos resultados	32
Princípio de análise de dados	32
Curvas-padrão e critérios de qualidade aplicáveis a dados em bruto	33
Número de cópias normalizado (NCN)	35
Conversão IS e relatórios MMR	36
Resumo dos critérios de qualidade	37
Resolução de problemas	38
Controlo de qualidade	39
Limitações	39
Características de desempenho	39

Limite de branco e limite de detecção	40
Linearidade	40
Entradas	40
Precisão	40
Estudo de concordância: Plasmídeo simples ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM) contra padrões de plasmídeo simples <i>ipsogen</i> (QIAGEN).	41
Referências	43
Símbolos	44
Informações de contacto	44
Informações para encomenda	45

Utilização prevista

O kit *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR destina-se à quantificação de transcritos de BCR-ABL p210 b2a2 ou b3a2 em amostras de medula óssea ou de amostras de sangue periférico de doentes com leucemia linfoblástica aguda (LLA) ou leucemia mieloide crónica (LMC) previamente diagnosticados com um evento de gene de fusão (GF) BCR-ABL MbcR. O teste destina-se a avaliar o nível de resposta molecular; os resultados podem ser usados para acompanhamento residual mínimo da doença.

Resumo e explicação

Contextualização da LMC

A LMC pertence ao grupo de neoplasias mieloproliferativas e, em >90% dos casos, caracteriza-se pela presença do cromossoma Filadélfia (cromossoma Ph).

Este cromossoma é o produto de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22, t(9;22), BCR ("breakpoint cluster region") situados no cromossoma 22 e o oncogene c-ABL proveniente do cromossoma 9. O gene de fusão correspondente, BCR-ABL, é transcrito para um mRNA de 8,5 kb, com 2 variantes de junção b2a2 (40% dos casos) e b3a2 (55% dos casos). Codifica uma proteína quimérica, p210, com elevada atividade de tirosina quinase. Os transcritos b2a3 e b3a3 representam menos de 5% dos casos. Um cromossoma Ph pode também ser detetado em 35% dos doentes adultos com LLA.

A incidência anual da LMC é aproximadamente 1–2 por 100 000 e a LMC é responsável por 20% das leucemias no adulto. Caracteriza-se clinicamente por um excesso de células mieloides que se diferenciam e funcionam normalmente. Os doentes de LMC serão diagnosticados em 90–95% dos casos na fase crónica ou estável da doença. Historicamente, dentro de uma média de 4 a 6 anos, os doentes entrariam numa fase acelerada, que conduziria a crise blástica e leucemia aguda, que é sempre fatal. O surgimento do Imatinib e, mais recentemente, da segunda geração de inibidores da tirosina quinase (TKI), alterou dramaticamente o curso natural da doença: a maior parte dos doentes continua agora em remissão e merece acompanhamento a longo prazo e monitorização da doença.

Monitorização da doença

Até à data, o objetivo da terapia da LMC era alcançar 100% de sobrevivência e negatividade do cromossoma Ph. Por isso, a monitorização da doença é essencial para avaliar a resposta ao tratamento e detetar precocemente a

recaída para cada doente individual. Com a terapia TKI, os doentes progridem tipicamente da remissão hematológica para a citogenética e depois para a molecular, correspondendo aos números decrescentes de células leucémicas e transcritos de BCR-ABL, conforme descrito na figura 1 abaixo.

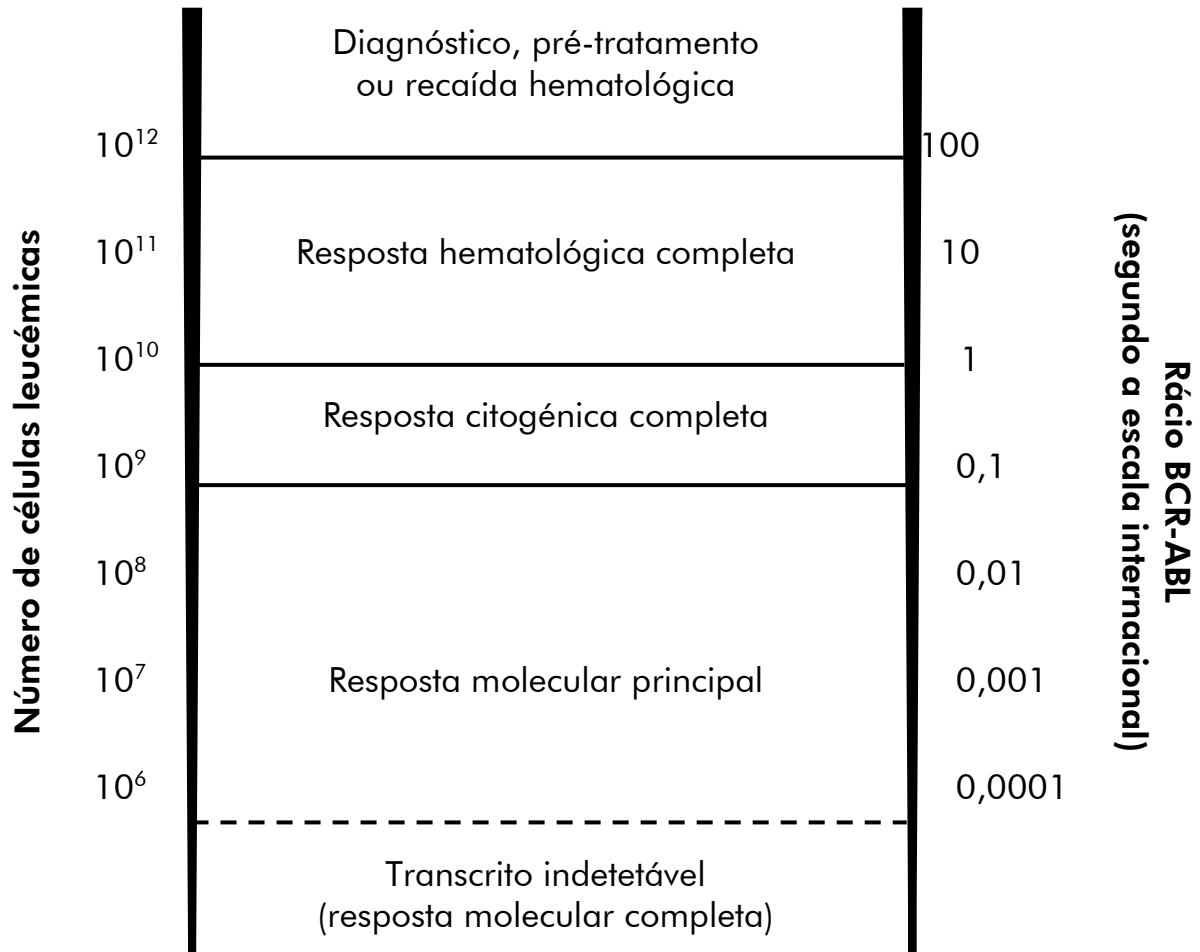


Figura 1: Adaptado da referência 1.

O método padrão para estimar a carga tumoral em doentes com LMC é a análise citogénica convencional (bandas G) nas metafases na medula óssea (MO). A resposta citogénica é avaliada em, pelo menos, 20 metafases na medula óssea. O nível de resposta citogénica é estimado com base na percentagem de metafases de cromossoma Ph positivo (ver tabela 1, referência 2). Contudo, esta avaliação depende dos desempenhos laboratoriais e tem uma baixa sensibilidade, a 5% quando são analisadas 20 metafases.

A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), que quantifica BCR-ABL Mbc r mRNA, nas amostras de sangue periférico (SP) faz agora parte das técnicas de monitorização da doença para a LMC em tratamento. É menos invasiva e mais sensível do que a citogenética convencional com análise das metafases na medula óssea.

As recomendações para a monitorização da doença LMC também foram atualizadas recentemente para incorporar a nova evidência clínica de ensaios clínicos e objetivos e ferramentas melhorados de monitorização da doença. As recomendações mais recentes para a definição da resposta e a monitorização dos doentes tratados com Imatinib provêm dos especialistas ELN (2).

De uma perspetiva técnica, foram feitos esforços por especialistas internacionais a fim de harmonizar testes e relatórios BCR-ABL Mbc (3–5). Além disso, foi validado recentemente um painel de referência sob os auspícios da OMS, para permitir uma normalização simples da quantificação de BCR-ABL (6).

Princípio do procedimento

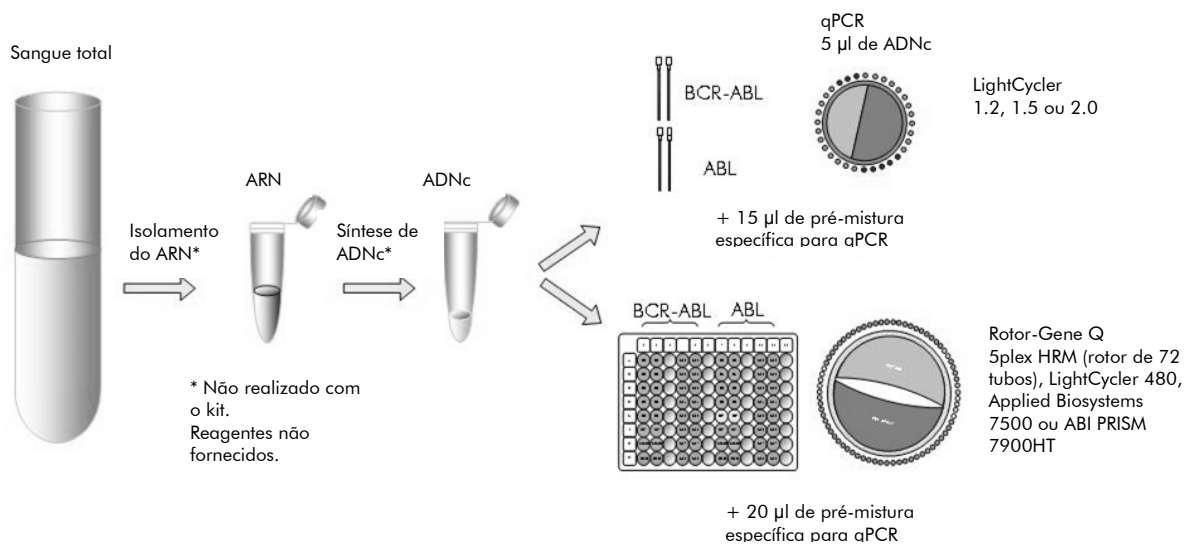


Figura 2: Isolamento do ARN, síntese do ADNc e qPCR.

A qPCR permite a quantificação exata de produtos de PCR durante a fase exponencial do processo de amplificação da PCR. Os dados quantitativos 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 exonuclease 5'→3' da ADN-polimerase *Thermus*

aquaticus (*Taq*). 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 exonuclease 5'→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 3). 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.

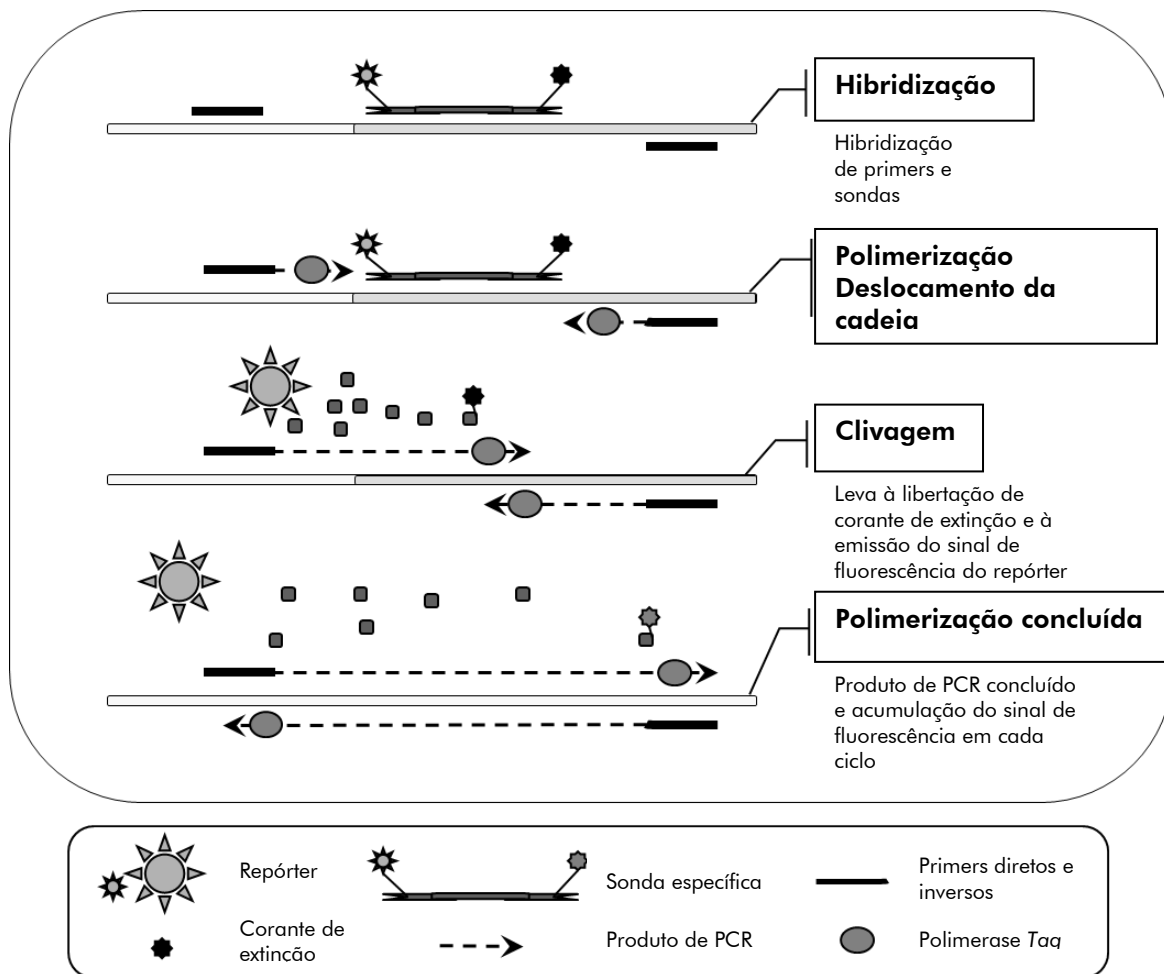


Figura 3: Princípio de reação. Por transcrição reversa do ARN total obtém-se o (ADN complementar) ADNc, o qual é depois amplificado por PCR usando um par de primers específicos e uma sonda de duplo corante interna específica (FAM™–TAMRA™). A sonda liga-se ao amplicon durante cada passo de hibridização 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'→3' da Taq ADN-polimerase. A clivagem continua até a sonda restante fundir o amplicon. Este processo liberta 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

ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit		(24)
N.º de catálogo		670723
Número de reações		24
High Positive RNA Control (controlo ARN positivo elevado)		3 x 10 µl
IS-MMR Calibrator (calibrador IS-MMR)		3 x 10 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (diluição do padrão de plasmídeo simples MbcR e ABL) (10 ¹ cópias/5 µl)	SP1-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (diluição do padrão de plasmídeo simples MbcR e ABL) (10 ² cópias/5 µl)	SP2-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (diluição do padrão de plasmídeo simples MbcR e ABL) (10 ³ cópias/5 µl)	SP3-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (diluição do padrão de plasmídeo simples MbcR e ABL) (10 ⁴ cópias/5 µl)	SP4-BCR-ABL MbcR & ABL	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (diluição do padrão de plasmídeo simples MbcR e ABL) (10 ⁵ cópias/5 µl)	SP5-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (diluição do padrão de plasmídeo simples MbcR e ABL) (10 ⁶ cópias/5 µl)	SP6-BCR-ABL MbcR & ABL	70 µl
Primers and Probe Mix ABL* (primers e mistura de sondas ABL*)	PPC-ABL 25x	110 µl

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

Continuação – Conteúdo do kit

Primers and Probe Mix BCR-ABL Mbc _r Fusion Gene [†] (primers e mistura de sondas, gene de fusão BCR-ABL Mbc _r) [†]	PPF-Mbc _r 25x	110 µl
ipsogen BCR-ABL1 Mbc _r IS-MMR Kit Handbook (inglês)		1

[†] Mistura de primers diretos e inversos específicos para o gene de fusão BCR-ABL Mbc_r mais uma sonda FAM–TAMRA específica.

Nota: Misture e centrifugue cuidadosamente os padrões (SP1–SP6), os primers e as misturas de sondas antes de os usar.

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.

Reagentes

- Reagentes para a purificação do ARN: os reagentes validados são o RNeasy[®] Midi Kit (QIAGEN, ref.^o 75144) ou o reagente TRIzol[®] (Thermo Fisher Scientific Inc, ref.^o 15596018 ou 15596026)
- Água de qualidade para PCR isenta de nuclease
- Tampão e polimerase *Taq* de ADN: os reagentes validados são a polimerase *Premix Ex Taq*[™] de ADN (Perfect Real Time) (TaKaRa, ref.^o RR039A) e a polimerase *Premix Ex Taq* de ADN (Probe qPCR) (TaKaRa, ref.^o RR390A). Ambos incluem 2x mistura principal de polimerase *Taq* de ADN e corantes de referência ROX[™]
- Reagentes para transcrição reversa: os reagentes validados são o Kit *ipsogen* RT, que inclui transcriptase reversa, 5x tampão de RT, 100 mM DTT, inibidor de RNase, iniciador aleatório e dNTPs (QIAGEN, ref.^o 679923); ou transcriptase reversa SuperScript[®] III, que inclui transcriptase reversa, 5x tampão de primeira cadeia e 100 mM DTT (Thermo Fisher Scientific Inc., ref.^o 18080044)
- Quando utilizar SuperScript III, são necessários os seguintes reagentes adicionais:
 - Inibidor de RNase: o reagente validado é o inibidor de ribonuclease recombinante RNaseOUT[™] (Thermo Fisher Scientific Inc., ref.^o 10777019)
 - Conjunto de dNTPs, qualidade para PCR
 - Nonâmero aleatório

Consumíveis

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

Equipamento

- Pipetas para microlitros* dedicadas para PCR (1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1000 μ l)
- Centrífuga de bancada* com rotor para tubos de ensaio de 0,2 ml/0,5 ml (capaz de atingir 10 000 rpm)
- Instrumento de PCR em tempo real:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ou outro instrumento Rotor-Gene; LightCycler 1.2, 1.5, 2.0 ou 480; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; ABI PRISM 7900HT SDS e material específico associado
- Termociclador* ou banho-maria* (passo de 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**, 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.

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

Precauções gerais

O testes de qPCR requerem 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:

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

Por conseguinte, recomendamos o seguinte:

- Utilização de material de laboratório sem nuclease (p. ex., pontas de pipetas, frascos-ampola de reação) e de luvas durante a realização do ensaio.
- 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.
- 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.).
- Manuseamento dos padrões (SP1–SP6) 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.

- Minimizar a exposição à luz dos primers e das misturas de sondas (tubos PPC e PPF).

- Misture e centrifugue cuidadosamente os tubos antes de os abrir.
- Conserve 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.

Manuseamento e armazenamento de amostras

As amostras de sangue total devem ser anticoaguladas com EDTA de potássio e guardadas a 2–8 °C durante um período máximo de 5 dias antes da extração do ARN.

Procedimento

Preparação da amostra de ARN

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

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

† Densidade ótica medida a 260 e 280 nm: A DO de 1,0 a 260 nm equivale a aproximadamente 40 µg/ml de ARN de cadeia simples. Um rácio A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,1 indica um ARN altamente purificado.

Protocolo: Transcriptase reversa com SuperScript III Reverse Transcriptase

Este protocolo destina-se à transcriptase reversa com SuperScript III Reverse Transcriptase. Ao usar o kit *ipsogen* RT, siga o protocolo no *Manual do kit ipsogen RT*.

Passos a seguir antes de começar

- Prepare dNTPs, 10 mM cada. Guarde a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em alíquotas.

Procedimento

- 1. Descongele todos os componentes necessários e coloque-os no gelo.**
- 2. Misture bem (sem usar o vórtex) e centrifugue por instantes (aproximadamente 10 s, 10 000 rpm, para recolher o líquido no fundo do tubo). Mantenha no gelo.**
- 3. Ajuste as amostras de ARN para $0,1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Pipete $10\ \mu\text{l}$ ($1\ \mu\text{g}$) de cada amostra de ARN em tubos rotulados separados. Pipete $10\ \mu\text{l}$ do controlo ARN positivo elevado, $10\ \mu\text{l}$ do calibrador IS-MMR e $10\ \mu\text{l}$ de água sem nuclease (como um controlo RT negativo) em tubos rotulados separados e processe-os em paralelo com as amostras de ARN, conforme descrito abaixo.**
- 4. Incube cada uma das amostras, e cada um dos controlos e calibradores ($10\ \mu\text{l}$ cada) durante 5 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ e arrefeça imediatamente em gelo durante 5 min.**
- 5. Centrifugue por instantes (aproximadamente 10 s, 10 000 rpm, para recolher o líquido no fundo do tubo). Mantenha no gelo.**
- 6. Prepare a mistura RT seguinte segundo o número de amostras, controlos e calibradores em processamento (tabela 1).**

Tabela 1: Preparação da mistura RT

Componente	Volume por amostra (μl)	Concentração final
Tampão de primeira cadeia, 5x (fornecido com SuperScript III Reverse Transcriptase)	5,0	1x
dNTPs (10 mM cada, a preparar previamente e guardados a -20 °C em alíquotas)	2,0	0,8 mM
Nonâmero aleatório (100 μ M)	5,25	21 μ M
RNaseOUT (40 U/ μ l)	0,5	0,8 U/ μ l
SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	1,0	8 U/ μ l
DTT (fornecido com SuperScript III Reverse Transcriptase)	1,25	–
Amostra de ARN aquecida, controlo ou calibrador IS-MMR (a acrescentar no passo 7)	10,0	40 ng/ μ l
Volume final	25,0	–

- 7. Pipete 15 μ l de mistura RT em cada tubo de PCR. Depois adicione 10 μ l (1 μ g) de ARN de amostra, controlo ou calibrador (do passo 4).**
- 8. Misture cuidadosamente (sem usar o vórtex) e centrifugue por instantes (aproximadamente 10 s, 10 000 rpm, para recolher o líquido no fundo do tubo).**
- 9. Programe o termociclador com o programa de transcrição reversa, conforme indicado na tabela 2.**

Tabela 2: Perfil de temperatura

Transcrição reversa 1	Temperatura: 25 °C Tempo: 10 min
Transcrição reversa 2	Temperatura: 50 °C Tempo: 60 min
Inativação	Temperatura: 85 °C Tempo: 5 min
Arrefecimento	Temperatura: 4 °C Tempo: 5 min

- 10. Coloque os tubos no termociclador e inicie o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 2.**
- 11. Depois de terminado o programa, centrifugue os tubos por instantes (aproximadamente 10 s, 10 000 rpm, para recolher o líquido no fundo do tubo). Mantenha os tubos em gelo ou a -20 °C até o qPCR ser realizado, de acordo com os seguintes protocolos, segundo o seu instrumento qPCR.**

Nota: para os instrumentos LightCycler 1.2, 1.5 e 2.0, cada preparação RT oferece ADNc para duas corridas 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. O kit foi concebido para testar 8 amostras diferentes de ADNc 3 vezes no mesmo ensaio.

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

Amostras	Reações
Com os primers e misturas de sondas ABL (PPC-ABL) (32 reações)	
8 amostras de ADNc	8 x 2 reações
1 controlo ADNc positivo elevado	2 reações
1 calibrador IS-MMR ADNc	2 reações
Padrões de plasmídeo simples	2 x 4 reações (SP3, SP4, SP5 e SP6, cada uma testada em duplicado)
Controlo RT negativo	2 reações
Controlo de água	2 reações
Com os primers e misturas de sondas BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc) (32 reações)	
8 amostras de ADNc	8 x 2 reações
1 controlo ADNc positivo elevado	2 reações
1 calibrador IS-MMR ADNc	2 reações
Padrões de plasmídeo simples	2 x 5 reações (SP1, SP2, SP3, SP5 e SP6, 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. O esquema do rotor na figura 4 apresenta um exemplo de um ensaio deste tipo.

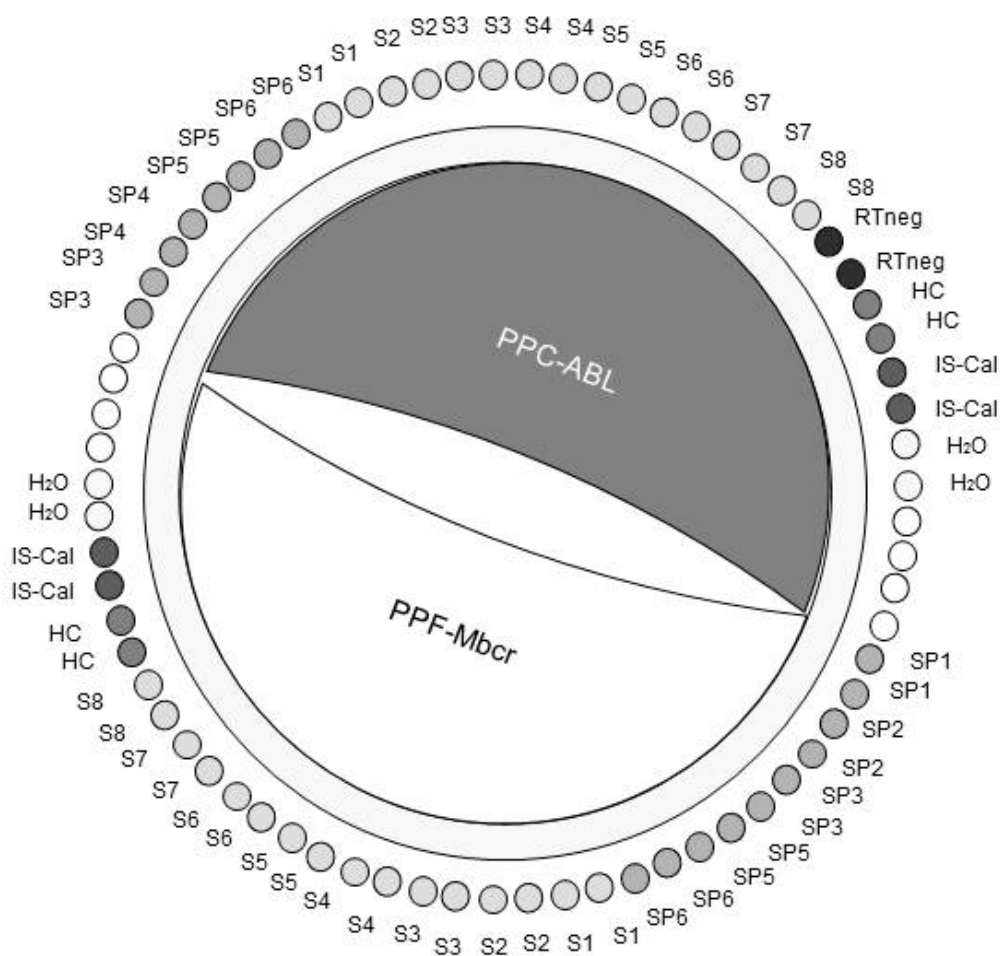


Figura 4: Configuração sugerida para rotor para cada ensaio com o kit ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR. SP1–SP6: Padrões BCR-ABL Mbcr e ABL; **HC:** Controle ADNc positivo elevado; **IS-Cal:** Calibrador IS-MMR; **RTneg:** Controle RT negativo; **S:** Amostra de ADNc; **H₂O:** controle de água.

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. **Agite no vórtex padrões, PPF-Mbcr e tubos PPC-ABL e centrifugue por instantes (aproximadamente 10 s, 10 000 rpm, para recolher o líquido no fundo do tubo).**
3. **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 μ l. 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-Mbcr). São incluídos volumes extra para compensar erros de pipetagem.

Tabela 4: Preparação da mistura de qPCR

Componente	1 reação (μl)	ABL: 32+1 reações (μl)	BCR-ABL Mbcr: 32+1 reações (μl)	Concentração final
<i>Pré-mistura Ex Taq, 2x</i>	12,5	412,5	412,5	1x
Primers e mistura de sondas, 25x	1	33	33	1x
Água para uso em PCR sem nuclease	6.5	214,5	214,5	–
Amostra (a acrescentar ao passo 5)	5	5 cada	5 cada	–
Volume total	25	25 cada	25 cada	–

4. **Distribua 20 μ l da pré-mistura qPCR por tubo.**
5. **Numa área diferente do laboratório e com o equipamento dedicado, adicione 5 μ l do produto RT (ADNc, 200 ng, ARN equivalente) obtido na transcrição reversa (ver “Protocolo: Transcriptase reversa com SuperScript III Reverse Transcriptase”, página 15) no tubo correspondente (volume total 25 μ l).**
6. **Misture cuidadosamente, pipetando para cima e para baixo.**

7. **Feche todos os tubos e coloque-os no termociclador de acordo com as recomendações do fabricante.**
8. **Programe o instrumento Rotor-Gene Q com o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 5.**

Tabela 5: Perfil de temperatura

Modo de análise	Quantificação
Manter 1	Temperatura: 95 °C Tempo: 10 s
Ciclagem	50 vezes 95 °C durante 5 s 60 °C durante 30 s com aquisição de fluorescência da FAM em Channel Green: Single (simples)
Manter 2	Temperatura: 36 °C Tempo: 1 min

9. **Clicar em "Gain Optimisation" (Otimização de aquisição de dados) na caixa de diálogo "New Run Wizard" (Assistente de nova execução) para abrir o diálogo "Auto-Gain Optimisation Setup" (Configuração de otimização de auto-aquisição). Definir o intervalo do canal verde desde "5 FI" para "Min Reading" (Leitura mín.) até "10 FI" para "Max Reading" (Leitura máx.) e o intervalo de aquisição aceitável desde -10 até 10.**
10. **Assinalar a caixa de verificação "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Efetuar otimização antes da 1.ª aquisição) e fechar a caixa de diálogo "Auto-Gain Optimisation Setup" (Configuração de otimização de auto-aquisição).**
11. **Iniciar o programa de ciclagem térmica.**
12. **Selecionar "Slope Correct" (Declive correto) para a análise. Recomendamos que o limiar seja definido em 0,03.**

Protocolo: qPCR em instrumentos Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS e 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. O kit foi concebido para testar 8 amostras diferentes de ADNc 3 vezes no mesmo ensaio.

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

Amostras	Reações
Com os primers e misturas de sondas ABL (PPC-ABL) (32 reações)	
8 amostras de ADNc	8 x 2 reações
1 controlo ADNc positivo elevado	2 reações
1 calibrador IS-MMR ADNc	2 reações
Padrões de plasmídeo simples	2 x 4 reações (SP3, SP4, SP5 e SP6, cada uma testada em duplicado)
Controlo RT negativo	2 reações
Controlo de água	2 reações
Com os primers e misturas de sondas BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc) (32 reações)	
8 amostras de ADNc	8 x 2 reações
1 controlo ADNc positivo elevado	2 reações
1 calibrador IS-MMR ADNc	2 reações
Padrões de plasmídeo simples	2 x 5 reações (SP1, SP2, SP3, SP5 e SP6, cada uma testada em duplicado)
Controlo de água	2 reações

Processamento de amostras em instrumentos Applied Biosystems, ABI PRISM e 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 5 apresenta um exemplo de um ensaio deste tipo.

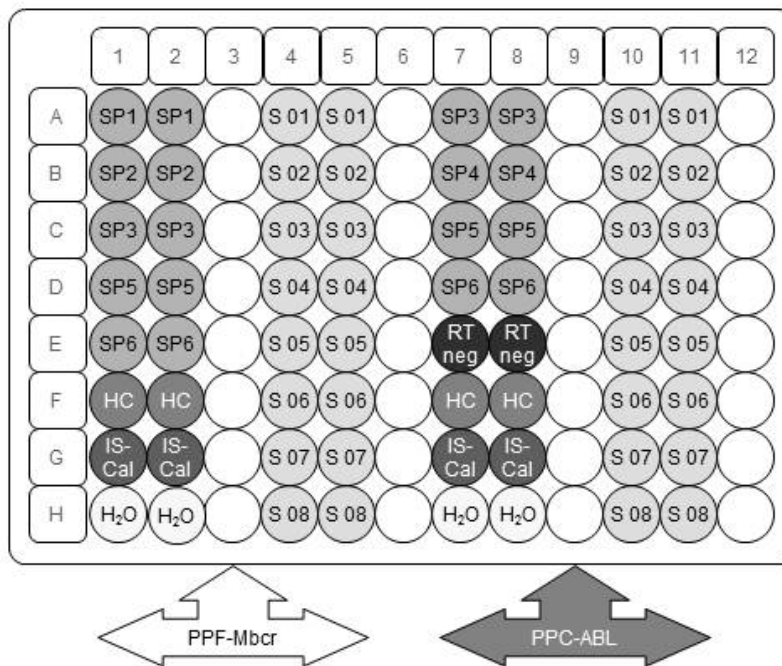


Figura 5: Configuração da placa sugerida para um ensaio com o kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR. SP1–SP6: Padrões BCR-ABL Mbcr e ABL; HC: Controlo ADNc positivo elevado; IS-Cal: Calibrador IS-MMR; RTneg: Controlo RT negativo; S: Amostra de ADNc; H₂O: controlo de água.

qPCR em instrumentos Applied Biosystems, ABI PRISM ou LightCycler 480

Nota: Realizar todos os passos no gelo.

Procedimento

1. **Descongele todos os componentes necessários e coloque-os no gelo.**
2. **Agite no vórtex padrões, ROX, PPF-Mbcr e tubos PPC-ABL e centrifugue por instantes (aproximadamente 10 s, 10 000 rpm, para recolher o líquido no fundo do tubo).**
3. **Prepare a seguinte mistura de qPCR de acordo com o número de amostras a processar. Usando equipamento de qPCR de placas de**

96 poços, recomendamos a realização de todas as medições em duplicado.

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 para instrumentos Applied Biosystems e ABI PRISM, calculada para alcançar um volume de reação final de 25 μ l. A tabela 8 descreve o esquema de pipetagem para a preparação de uma mistura de reagentes para o instrumento LightCycler 480, calculada para alcançar um volume de reação final de 25 μ l. 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-Mbcr). São incluídos volumes extra para compensar erros de pipetagem.

Tabela 7: Preparação de mistura qPCR para instrumentos Applied Biosystems e ABI PRISM

Componente	1 reação (μl)	ABL: 32+1 reações (μl)	BCR-ABL Mbcr: 32+1 reações (μl)	Concentração final
<i>PrY-mistura Ex Taq</i> , 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primers e mistura de sondas, 25x	1	33	33	1x
Corante ROX I, 50x (ABI PRISM 7900HT) ou corante ROX II, 50x (Applied Biosystems 7500)	0,5	16,5	16,5	1x
Água para uso em PCR sem nuclease	6	198	198	–
Amostra (a acrescentar ao passo 5)	5	5 cada	5 cada	–
Volume total	25	25 cada	25 cada	–

Tabela 8: Preparação de mistura qPCR para LightCycler 480

Componente	1 reação (μl)	ABL: 32+1 reações (μl)	BCR-ABL Mbc: 32+1 reações (μl)	Concentração final
<i>Pré-mistura Ex Taq, 2x</i>	12,5	412,5	412,5	1x
Primers e mistura de sondas, 25x	1	33	33	1x
Água para uso em PCR sem nuclease	6,5	214,5	214,5	–
Amostra (a acrescentar ao passo 5)	5	5 cada	5 cada	–
Volume total	25	25 cada	25 cada	–

4. Distribua 20 μl da pré-mistura qPCR por poço.
5. Numa área diferente do laboratório e com o equipamento dedicado, adicione 5 μl do produto RT (ADNc, 200 ng, ARN equivalente) obtido na transcrição reversa (ver “Protocolo: Transcriptase reversa com SuperScript III Reverse Transcriptase”, página 15) no respetivo poço (volume total 25 μl).
6. Misture cuidadosamente, pipetando para cima e para baixo.
7. Feche a placa e centrifugue brevemente (300 x g, aproximadamente 10 s).
8. Coloque a placa no termociclador de acordo com as recomendações do fabricante. Programe o termociclador com o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 9 para instrumentos Applied Biosystems e ABI PRISM ou na tabela 10 para o instrumento LightCycler 480.

Tabela 9: Perfil de temperatura para instrumentos Applied Biosystems e ABI PRISM

Modo de análise	Curvas-padrão — Quantificação absoluta
Manter 1	Temperatura: 95 °C Tempo: 10 s
Ciclagem	50 vezes 95 °C durante 5 s 60 °C durante 30 s com aquisição de fluorescência da FAM: Single (simples); corante de extinção: TAMRA
Manter 2	Temperatura: 36 °C Tempo: 1 min

Tabela 10: Perfil de temperatura para o instrumento LightCycler 480

Modo de análise	Quantificação absoluta ("Abs Quant")
Formatos de detecção	Selecione "Simple Probe" (amostra simples) na janela de formatos de detecção
Manter 1	Temperatura: 95 °C Tempo: 10 s
Ciclagem	50 vezes 95 °C durante 5 s 60 °C durante 30 s com aquisição de fluorescência da FAM correspondendo a (483–533 nm) para LC versão 01 e (465–510 nm) LC versão 02
Manter 2	Temperatura: 36 °C Tempo: 1 min

- 9. Para Applied Biosystems 7500 e ABI PRISM 7900HT SDS, siga o passo 9a. Para o instrumento LightCycler 480, siga o passo 9b.**
- 9a. Applied Biosystems e ABI PRISM: Recomendamos que o limiar seja definido para 0,1 no passo da análise no instrumento. Inicie o programa de ciclagem, conforme indicado na tabela 9.**
- 9b. Instrumento 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 10.**

Protocolo: qPCR nos instrumentos LightCycler 1.2, 1.5 e 2.0

Utilizando instrumentos capilares, recomendamos a medição das amostras em duplicado e dos controlos apenas uma vez, conforme indicado na tabela 11. O kit foi concebido para testar 4 amostras diferentes de ADNc 6 vezes no mesmo ensaio.

Tabela 11: Número de reações para instrumentos LightCycler 1.2, 1.5 e 2.0

Amostras	Reações
Com os primers e misturas de sondas ABL (PPC-ABL) (16 reações)	
4 amostras de ADNc	4 x 2 reações
1 controlo ADNc positivo elevado	1 reação
1 calibrador IS-MMR ADNc	1 reação
Padrões de plasmídeo simples	1 x 4 reações (SP3, SP4, SP5 e SP6)
Controlo RT negativo	1 reação
Controlo de água	1 reação
Com os primers e misturas de sondas BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc) (16 reações)	
4 amostras de ADNc	4 x 2 reações
1 controlo ADNc positivo elevado	1 reação
1 calibrador IS-MMR ADNc	1 reação
Padrões de plasmídeo simples	1 x 5 reações (SP1, SP2, SP3, SP5 e SP6)
Controlo de água	1 reação

Processamento de amostras em instrumentos LightCycler 1.2, 1.5 e 2.0

Recomendamos o teste de, pelo menos, 4 amostras de ADNc no mesmo ensaio para otimizar a utilização de padrões, de primers e misturas de sondas. O esquema capilar na figura 6 apresenta um exemplo de um ensaio deste tipo.

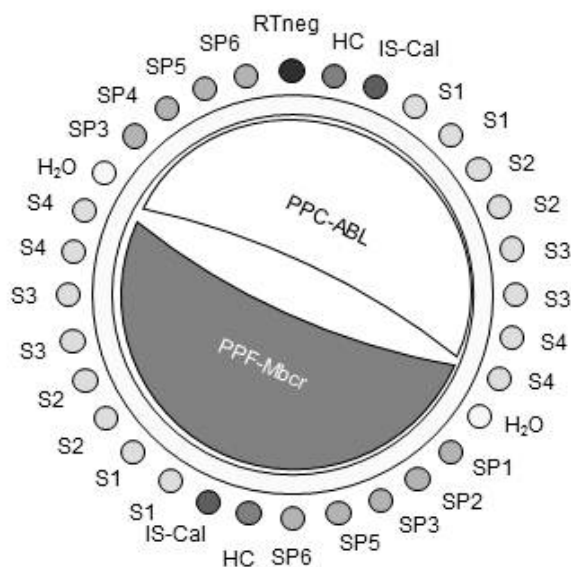


Figura 6: Configuração sugerida para rotor para cada ensaio com o kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR. SP1–SP6: Padrões BCR-ABL Mbcr e ABL; **HC:** Controle ADNc positivo elevado; **IS-Cal:** Calibrador IS-MMR; **RTneg:** Controle RT negativo; **S:** Amostra de ADNc; **H₂O:** controle de água.

qPCR nos instrumentos LightCycler 1.2, 1.5 e 2.0

Nota: Realizar todos os passos no gelo.

Procedimento

1. **Descongele todos os componentes necessários e coloque-os no gelo.**
2. **Agite no vórtex padrões, PPF-Mbcr e tubos PPC-ABL e centrifugue por instantes (aproximadamente 10 s, 10 000 rpm, para recolher o líquido no fundo do tubo).**
3. **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 12 descreve o esquema de pipetagem para a preparação de uma mistura de reagentes, calculada para alcançar um volume de reação final de 20 μ l. 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-Mbcr). São incluídos volumes extra para compensar erros de pipetagem.

Tabela 12: Preparação de mistura qPCR para instrumentos LightCycler 1.2, 1.5 e 2.0

Componente	1 reação (µl)	ABL: 16+1 reações (µl)	BCR-ABL Mbc: 16+1 reações (µl)	Concentração final
<i>Pré-mistura Ex Taq, 2x</i>	10	170	170	1x
Primers e mistura de sondas, 25x	0,8	13,6	13,6	1x
Água para uso em PCR sem nuclease	4,2	71,4	71,4	–
Amostra (a acrescentar ao passo 5)	5	5 cada	5 cada	–
Volume total	20	20 cada	20 cada	–

4. Distribua 15 µl da pré-mistura qPCR por capilar.
5. Numa área diferente do laboratório e com o equipamento dedicado, adicione 5 µl do produto RT (ADNc, 200 ng, ARN equivalente) obtido na transcrição reversa (ver “Protocolo: Transcriptase reversa com SuperScript III Reverse Transcriptase”, página 15) no capilar correspondente (volume total 20 µl).
6. Misture cuidadosamente, pipetando para cima e para baixo.
7. Coloque os capilares nos adaptadores fornecidos com o aparelho e centrifugue por breves instantes (700 x g, aproximadamente 10 s).
8. Carregue os capilares no termociclador de acordo com as recomendações do fabricante.
9. Programe o instrumento LightCycler 1.2, 1.5 ou 2.0 com o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 13.

Tabela 13: Perfil de temperatura

Modo de análise	Quantificação
Manter 1	Temperatura: 95 °C Tempo: 10 s Rampa: 20
Ciclagem	50 vezes 95 °C durante 5 s; rampa: 20 60 °C durante 30 s; rampa: 20; com aquisição de fluorescência da FAM: Single (simples)
Manter 2	Temperatura: 36 °C Tempo: 1 min Rampa: 20

10. Para o LightCycler 1.2 e 1.5, siga o passo 10a. Para o LightCycler 2.0, siga o passo 10b.

10a. LightCycler 1.2 e 1.5: são recomendados o F1/F2 e o modo "2nd derivative analysis" (2.º modo de análise derivativa). Inicie o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 13.

10b. 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 13.

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 plasmídeos. Para garantir curvas-padrão precisas, usamos 4 diluições do padrão para ABL e 5 diluições do padrão para Mbc. O kit também inclui um calibrador IS-MMR que permite converter resultados para a escala internacional. As figuras 7 e 8 apresentam exemplos de curvas de amplificação TaqMan obtidas para padrões, o calibrador IS-MMR e o controlo ARN positivo elevado com o kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR.

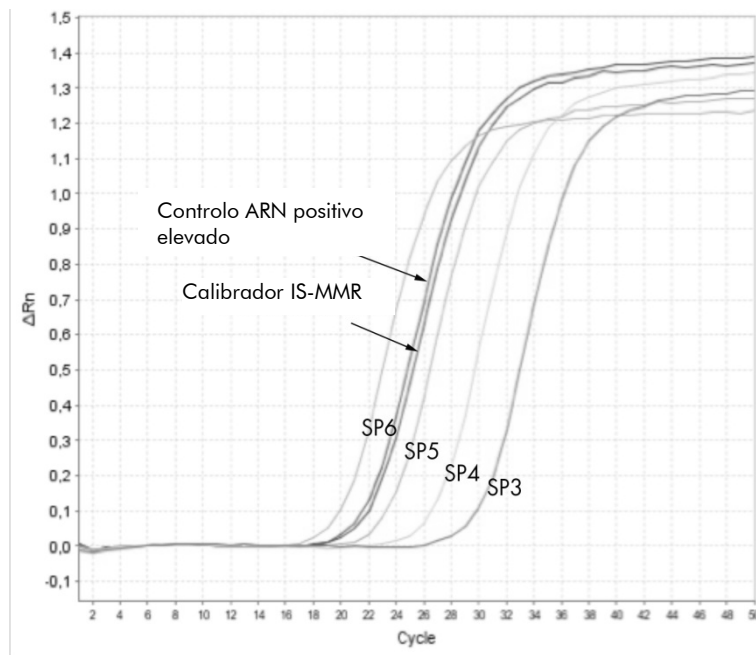


Figura 7: Detecção de ABL com padrões SP3, SP4, SP5 e SP6. 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 cópias/ $5 \mu\text{l}$.

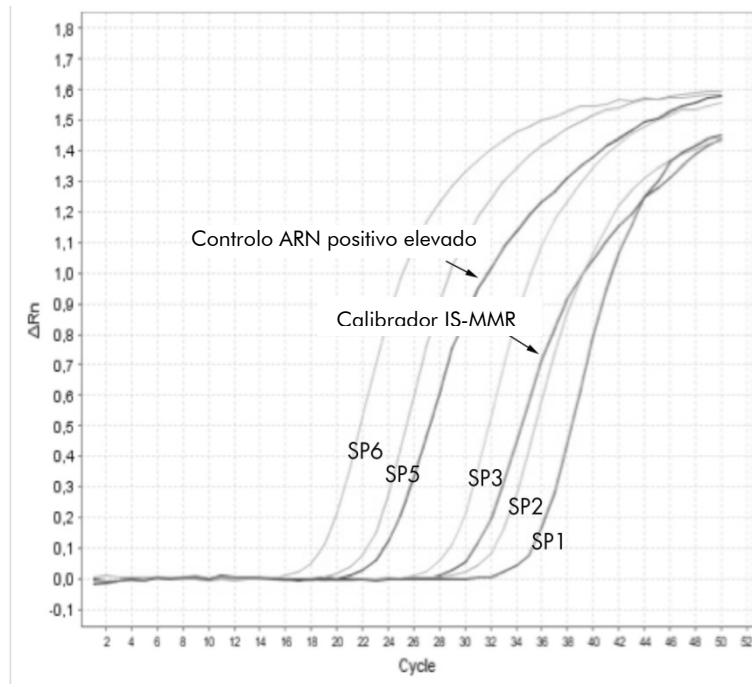


Figura 8: Detecção de BCR-ABL Mbc com padrões SP1, SP2, SP3, SP5 e SP6. 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 cópias/ $5 \mu\text{l}$.

Curvas-padrão e critérios de qualidade aplicáveis a dados em bruto

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 (7).

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

Curvas-padrão

Os dados em bruto podem ser colados para um ficheiro Excel[®] para análise.

Para cada gene (ABL e BCR-ABL), os valores C_T em bruto obtidos das diluições do padrão de plasmídeo são traçados segundo o número de cópia do registo (3, 4, 5 e 6 para SP3, SP4, SP5 e SP6; 1, 2, 3, 5 e 6 para SP1, SP2, SP3, SP5 e SP6). A figura 9 apresenta um exemplo de uma curva-padrão ABL teórica calculada em 4 diluições do padrão. A figura 10 apresenta um exemplo de uma curva-padrão BCR-ABL teórica calculada em 5 diluições do padrão.

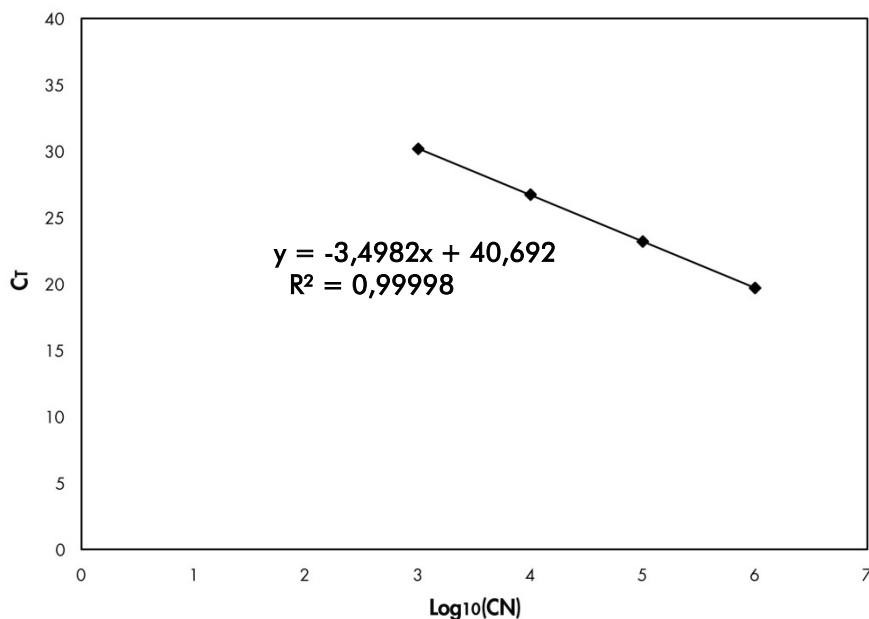


Figura 9: Curva-padrão teórica para ABL calculada a partir de 4 diluições do padrão. Uma curva de regressão linear ($y = ax + b$) é calculada, sendo que a é o declive da linha e b é a intersecção y , que é a coordenada y do ponto em que a linha cruza o eixo y . A sua equação e coeficiente de determinação (R^2) são impressos no gráfico.

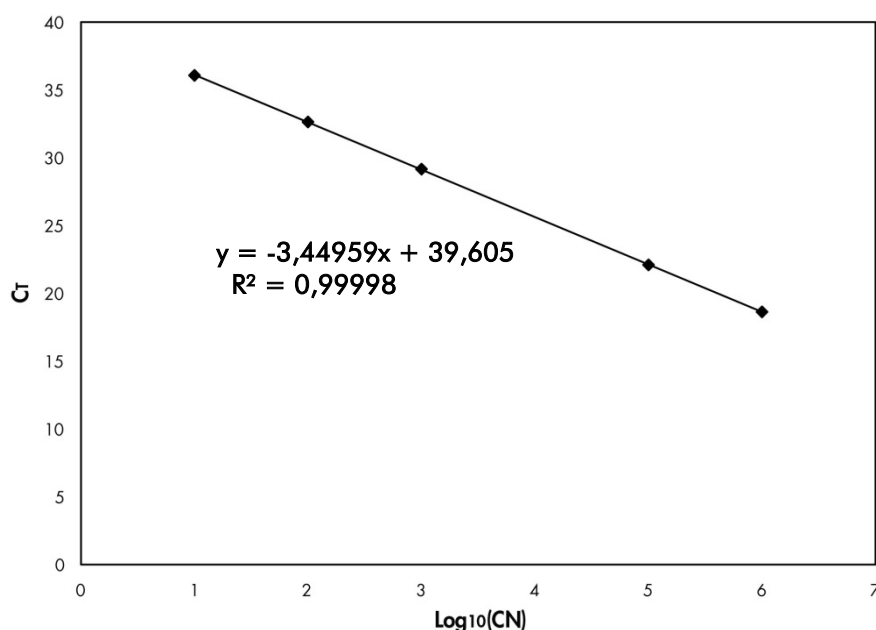


Figura 10: Curva-padrão teórica para BCR-ABL calculada a partir de 5 diluições do padrão. Uma curva de regressão linear ($y = ax + b$) é calculada, sendo que a é o declive da linha e b é a intersecção y , que é a coordenada y do ponto em que a linha cruza o eixo y . A sua equação e coeficiente de determinação (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 $>0,95$ (7). Contudo, é desejável um valor para $R^2 >0,98$ para resultados precisos (3).

Nota: A diluição do padrão SP1 (plasmídeo BCR-ABL, 10 cópias) tem de ser detetada e incluída na curva-padrão BCR-ABL.

Controlo da qualidade em todos os valores ABL

Má qualidade do ARN ou problemas durante os passos qPCR resulta em números de cópias ABL baixos (ABL_{CN}). A sensibilidade ótima é alcançada com amostras que deem $ABL_{CN} \geq 10\,000$ cópias. Este critério no ABL_{CN} também se aplica ao controlo ARN positivo elevado e ao calibrador IS-MMR.

RT negativo e controlos da água

Controlos sem modelo (NTC) para o passo PCR (controlo da água) e passo de transcrição reversa (controlo RT negativo) devem dar zero CN para ABL e BCR-ABL Mbc. Um resultado positivo para estes NTCs indica contaminação cruzada durante a transcrição reversa e/ou a qPCR.

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 BCR-ABL deve ser usada para transformar valores C_T em bruto (obtidos com PPF-Mbc) para as amostras desconhecidas em números de cópia BCR-ABL ($BCR-ABL\ Mbc_{CN}$).

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

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

Calcula o resultado NCN para o controlo ARN positivo elevado (NCN_{HC}), o calibrador IS-MMR (NCN_{cal}) e cada amostra ($_{amostra} NCN$).

Controlo ARN positivo elevado e calibrador IS-MMR

Estes controlos permitem a monitorização dos passos de transcrição reversa e de amplificação de ABL e BCR-ABL Mbc durante a quantificação do transcrito.

Controlo da qualidade no resultado NCN_{cal}

Nota: O resultado NCN obtido para o calibrador IS-MMR, testado com o kit *ipsogen* BCR-ABL Mbc IS-MMR em combinação com os reagentes e os instrumentos validados (ver “Materiais fornecidos”, página 10, e “Materiais necessários, mas não fornecidos”, página 11), tem de estar dentro do intervalo 0,05–0,3. Caso contrário, os valores NCN não podem ser convertidos para a escala internacional. Além disso, todo o ensaio tem de ser rejeitado se o controlo ARN positivo elevado não for detetado.

Conversão IS e relatórios MMR

Nota: Antes da interpretação, consulte o valor indicado no rótulo do tubo do calibrador IS-MMR ou no certificado da análise que acompanha o kit.

Use o resultado NCN (NCN_{cal}) do calibrador IS-MMR experimental e o respetivo valor atribuído (valor IS-Cal), indicado no certificado da análise, para calcular o número de cópias normalizado na escala internacional ($IS-NCN_{amostra}$).

$$IS-NCN_{amostra} = \frac{NCN_{amostra} \times \text{valor IS-Cal}}{NCN_{cal}}$$

Determine o estado MMR de cada amostra de acordo com os seguintes critérios.

- **$IS-NCN_{amostra} \leq 0,05$** : resposta molecular principal
- **$0,05 < IS-NCN_{amostra} < 0,15$** : zona cinzenta à volta do corte MMR, resultado inconclusivo
- **$IS-NCN_{amostra} \geq 0,15$** : nenhuma resposta molecular principal

O resultado $IS-NCN_{HC}$ (NCN na escala internacional para o controlo ARN positivo elevado) não deve dar nenhuma resposta molecular principal.

A figura 11 apresenta um exemplo de monitorização do doente com resultados NCN e IS-NCN.

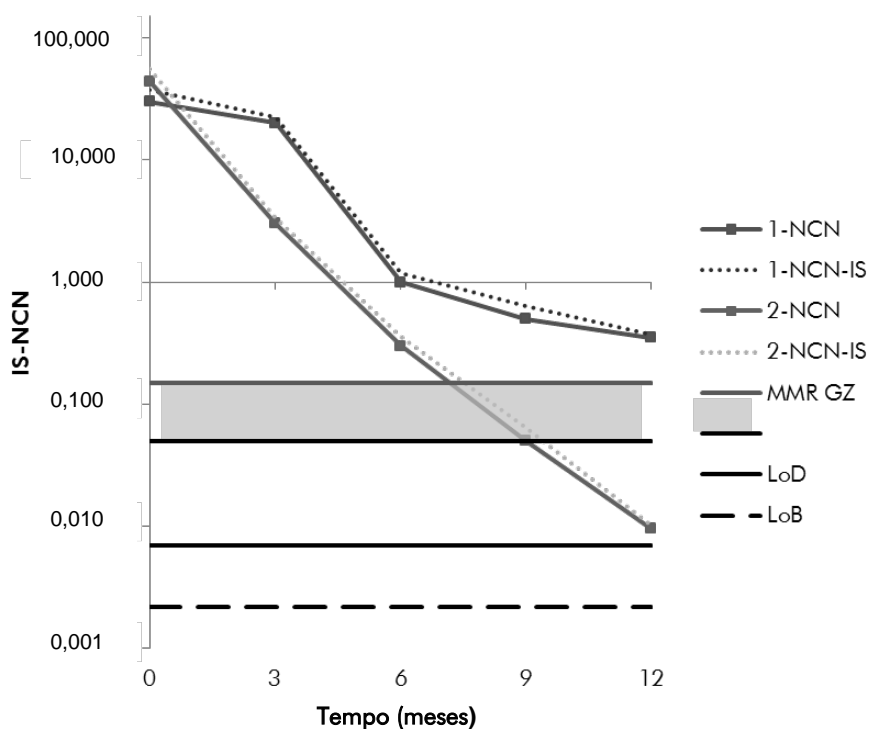


Figura 11: Curvas de monitorização para estado MMR do doente com o kit ipsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR. NCN: número de cópias normalizado; NCN-IS: escala internacional de número de cópias normalizado; MMR GZ: zona cinzenta MMR (GZ), resultado inconclusivo; LoD: limite de deteção; LoB: nível de fundo.

Resumo dos critérios de qualidade

A tabela 14 resume os vários critérios de qualidade e os valores ou resultados associados.

Tabela 14: Resumo dos critérios de qualidade

Critérios	Valores/resultados aceitáveis
Variações em valores C_T entre replicados	$\leq 2 C_T$ se o valor médio $C_T > 36$ $\leq 1,5 C_T$ se o valor médio $C_T \leq 36$
Declive para curvas-padrão	Entre $-3,0$ e $-3,9$
R^2 para curvas-padrão	Pelo menos $>0,95$ melhor se $>0,98$
Diluição do padrão SP1 (BCR-ABL 10 cópias de plasmídeo)	Tem de ser detetado e incluído na curva-padrão
Controlo da qualidade no valor ABL_{CN} para amostras de doentes, controlo ARN positivo elevado e calibrador IS-MMR	$ABL_{CN} > 10\ 000$ cópias de ABL para alcançar a sensibilidade ótima
Controlos PCR (água) e transcrição reversa (RT negativo)	Para cada $ABL_{CN} = 0$ e $Mbcr_{CN} = 0$
NCN obtido para calibrador IS-MMR (NCN_{cal})	Tem de estar dentro do intervalo $0,05-0,3$
Controlo ARN positivo elevado	Tem de ser detetado
NCN obtido para o controlo ARN positivo elevado convertido para a escala internacional ($IS-NCN_{HC}$)	Estado: nenhuma resposta molecular principal

Resolução de problemas

Para obter mais informações, consulte a página de perguntas frequentes no nosso Centro de Suporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre prontos a responder a qualquer questão que possa ter sobre as informações e protocolo constantes deste manual ou sobre as tecnologias de amostragem e ensaio (para informações de contacto, consulte “Informações de contacto”, página 44).

Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Total, certificado pela norma ISO da QIAGEN, todos os lotes do Kit *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR são testados quanto às especificações predeterminadas para garantir uma qualidade constante do produto. Certificados de análise estão disponíveis quando solicitado através de www.qiagen.com/support/.

Limitações

Os utilizadores devem dispor de formação e estar familiarizados com esta tecnologia antes da utilização do dispositivo.

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) (8, 9) e está em conformidade com as recomendações internacionais atualizadas. O kit contém um calibrador IS-MMR, normalizado para a escala internacional, o que permite a conversão dos resultados NCN para a escala internacional e comunicar o estado MMR (resposta molecular principal).

Todos os lotes do calibrador IS-MMR têm um valor atribuído derivado diretamente de uma calibração face ao material de referência principal certificado (International Genetic Reference Panel for the quantitation of BCR-ABL translocation by RQ-PCR (1st I.S.), ref. 09/138) da NIBSC OMS.

Cada kit vem acompanhado de um certificado de análise indicando o valor atribuído do calibrador IS-MMR.

O kit deve ser utilizado observando as instruções constantes deste manual em combinação com reagentes e instrumentos validados (ver “Materiais necessários, mas não fornecidos”, página 11). Qualquer outra utilização não indicada deste produto e/ou modificação dos componentes anulará qualquer responsabilidade da QIAGEN.

Características de desempenho

Nota: as características de desempenho foram estabelecidas usando o Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System em combinação com o kit *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR e reagentes adicionais validados (ver “Materiais necessários, mas não fornecidos”, página 11).

Limite de branco e limite de detecção

O limite de branco (LoB) e o limite de detecção (LoD) foram determinados de acordo com a diretriz CLSI/NCCLS EP17-A.

O nível de fundo (LoB) foi determinado em amostras negativas de doadores saudáveis (11 amostras, 69 medições) e revelou ser igual a 0,0022 BCR-ABL Mbcn NCN.

O limite de detecção (LoD ou sensibilidade analítica) foi determinado em amostras que se sabiam positivas baixas ($n = 8$, 74 medições) e revelou ser igual a 0,0069 BCR-ABL Mbcn NCN.

- **NCN \leq LoB:** BCR-ABL Mbcn não detetado
- **LoB $<$ NCN $<$ LoD:** BCR-ABL Mbcn detetado, mas não quantificado
- **NCN \geq LoD:** BCR-ABL Mbcn quantificado

Linearidade

A linearidade foi determinada de acordo com a diretriz CLSI/NCCLS EP6-A.

O estudo foi realizado em misturas de ARN positivo e negativo extraído de linhas de células. Foram testados onze níveis diferentes em triplicados. Os resultados obtidos nestas amostras mostram que o ensaio *ipsogen* BCR-ABL Mbcn IS-MMR é linear num intervalo entre 0,003 e 65 BCR-ABL Mbcn NCN.

Entradas

Foram selecionados para o estudo cinco ARNs diferentes com vários níveis NCN BCR-ABL Mbcn. Foram testadas quantidades diferentes de ARN e ADNc para avaliar o impacto da entrada em resultados NCN. Os resultados mostraram que a variação da entrada ARN tinha um impacto limitado nos resultados NCN, enquanto a entrada ADNc foi um fator mais sensível consoante se utilizasse mais ou menos material. Em consequência disso, é recomendada uma entrada de 1 μ g de ARN e 5 μ l de ADNc para executar o teste.

Precisão

A precisão foi determinada de acordo com a diretriz CLSI/NCCLS EP5-A2.

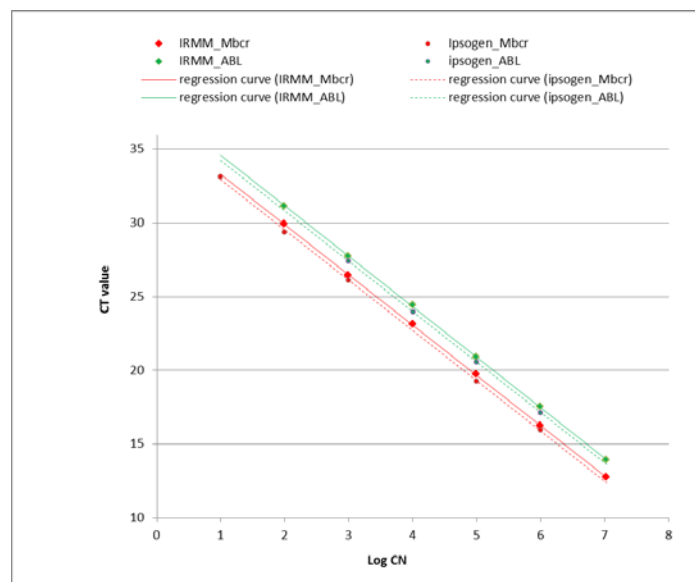
O estudo da precisão foi realizado em 13 amostras diferentes testadas 42 vezes em duplicados ($n = 84$). Estas amostras eram representativas do nível diferente da expressão de BCR-ABL Mbcn em amostras de doentes à volta e acima do valor MMR. O coeficiente de variação global à volta do valor MMR revelou-se igual a 25%.

Estudo de concordância: Plasmídeo simples ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM) contra padrões de plasmídeo simples *ipsogen* (QIAGEN).

As definições de funcionamento mais recentes da resposta molecular do BCR-ABL1 Mbcr na LMC são estabelecidas pelo ELN/EUTOS Molecular Monitoring Steering Group, recomendando a utilização do plasmídeo ERM-AD623 BCRABL1 (IRMM, Bélgica): Cross, N.C., et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia (2015) *Leukemia*. **29**, 999.

Para cumprir esta recomendação, a QIAGEN realizou um estudo de concordância para comparar o plasmídeo simples *ipsogen* de vários alvos, usado no Kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR (24) CE (ref.ª 670723) com o plasmídeo ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM).

A comparação foi baseada no rácio do número de cópias normalizadas (NCN) BCR-ABL1 Mbcr/ABL1, avaliado utilizando qualquer uma das duas diluições padrão (*ipsogen* ou ERM-AD623 BCR-ABL1), em amostras de controlo incluídas em kits *ipsogen* e em material de referência certificado do 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.

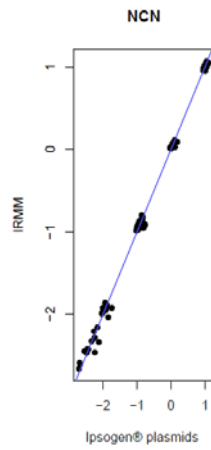


curva de regressão

Valore Ct

Log CN

Figura 12. As curvas padrão dos plasmídeos ERM-AD623 BCR-ABL1 e *ipsogen* estão alinhadas.



NCN

IRMM

Plasmídeos *ipsogen*®

ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit.

Figura 13. Valores de NCN de ERM-AD623 BCR-ABL1 versus *ipsogen*.

O estudo da QIAGEN conclui que não existe diferença estatística: os padrões do plasmídeo simples ERM-AD623 BCR-ABL1 e do plasmídeo simples *ipsogen* fornecem resultados equivalentes.

Referências

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.

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



Global Trade Item Number



Limites de temperatura



Fabricante



Consulte as instruções de utilização

Informações de contacto

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico em www.qiagen.com/Support, ligue 00800-22-44-6000 ou contacte um dos departamentos de assistência técnica ou distribuidores locais da QIAGEN (consulte o verso do manual ou visite www.qiagen.com).

Informações para encomenda

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit (24)	Para 24 reações: Padrões de plasmídeo simples MbcR e ABL, controlo ARN positivo elevado, calibrador IS-MMR, primers e misturas de sondas ABL, gene de fusão de primers e misturas de sondas BCR-ABL MbcR	670723
Rotor-Gene Q MDx — para análise PCR em tempo real validada para IVD em aplicações clínicas		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclador de PCR em tempo real e analisador de alta resolução de <i>melting</i> 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 <i>melting</i> 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
<i>ipsogen</i> RT Kit — para transcrição reversa		
<i>ipsogen</i> RT Kit	Transcriptase reversa, primer aleatório, DTT, dNTP, inibidor de RNase, tampão RT	679923
RNeasy Kits — para purificação de RNA total		
RNeasy Midi Kit (50)	Para 50 preparações de ARN: 50 colunas para centrifugação RNeasy Midi, tubos de colheita (15 ml), reagentes e tampões sem RNase	75144

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

Acordo de licença limitada

A utilização deste produto equivale ao acordo, por parte de qualquer comprador ou utilizador do kit *ipsogen* BCR-ABL1 MbcrlS-MMR com os seguintes termos:

1. O kit *ipsogen* BCR-ABL1 MbcrlS-MMR pode ser usado somente de acordo com o *Manual do kit ipsogen BCR-ABL1 MbcrlS-MMR* e apenas para utilização com os componentes contidos no kit. A QIAGEN não concede qualquer licença ao abrigo de sua propriedade intelectual para usar ou incorporar os componentes englobados neste kit em qualquer componente não incluído neste kit, exceto conforme descrito no *Manual do kit ipsogen BCR-ABL1 MbcrlS-MMR* e quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com.
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 infrinjam 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.

HB-1362-003 © 2013–2016 QIAGEN. Todos os direitos reservados.

www.qiagen.com

