

Manual do kit *ipsogen*[®] BCR-ABL1 mbcr



Versão 1

IVD

Diagnóstico *in vitro* quantitativo

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



REF

670023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANY

R2

MAT

1072506PT



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 produtos e serviços avançados e de elevada qualidade da nossa empresa são garantia de 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.

Índice

Finalidade da utilização	5
Resumo e explicação	5
Princípio do procedimento	6
Materiais fornecidos	9
Conteúdo do kit	9
Materiais necessários, mas não fornecidos	10
Avisos e precauções	11
Precauções gerais	12
Armazenamento e manuseamento de reagente	12
Procedimento	14
Preparação da amostra de ARN	14
Protocolos	
■ transcrição reversa EAC normalizada recomendada	14
■ qPCR em instrumentos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ou RotorGene Q 5plex HRM com rotor de 72 tubos	17
■ qPCR em instrumento ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS e LightCycler 480	21
■ qPCR nos instrumentos LightCycler 1.2 e 2.0	26
■ qPCR no instrumento SmartCycler	30
Interpretação dos resultados	33
Princípio de análise de dados	33
Results (Resultados)	34
Guia de resolução de problemas	36
Controlo da qualidade	40
Limitações	40
Características de desempenho	41
Estudos não clínicos	41
Estudos clínicos	43
Referências	46
Símbolos	47
Informações de contacto	48

Finalidade da utilização

O kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr destina-se à quantificação de transcritos BCR-ABL p190 em amostras de medula óssea ou de amostras de sangue periférico de doentes com leucemia linfoblástica aguda de Ph-positivo (LLA) previamente diagnosticados com um evento de gene de fusão (GF) BCR-ABL mbcr. Os resultados obtidos destinam-se à monitorização da eficácia do tratamento em doentes sujeitos a terapia e ao acompanhamento da doença residual mínima (DRM) para monitorizar a recaída.

Resumo e explicação

O cromossoma Filadélfia (Ph) é a aberração cariotípica mais frequente em adultos com LLA. Ocorre em 20–30% de todos os doentes adultos com LLA, com a incidência a subir para mais de 50% em doentes com 50 anos ou mais.

Nesta translocação, o segmento 3' do proto-oncogene ABL no cromossoma 9 justapõe-se ao segmento 5' do gene BCR no cromossoma 22. O GF BCR-ABL é o produto do cromossoma Ph e é uma proteína de tirosina quinase constitutivamente ativa.

As quebras no gene ABL ocorrem tipicamente no primeiro intrão. As quebras no gene BCR ocorrem geralmente numa das seguintes 3 regiões: uma região de 5,8 kb de exões 12–16, chamada *major breakpoint cluster region* (Mbcr), uma sequência do primeiro intrão de 55 kb, chamada *minor breakpoint cluster region* (mbcr) e a *micro breakpoint cluster region* (μ -bcr).

Pontos de quebra (breakpoints) ocorridos no exão de união mbcr 1 (e1) com o segundo exão do gene ABL (a2), resultando num transcrito de fusão mais pequeno, e1a2, que codifica uma proteína quimérica 190 kDa (p190) (figura 1). A proteína p190 BCR-ABL só se observa em LLA de Ph+, enquanto a proteína p210 BCR-ABL é comum a 20–40% dos doentes com LLA de Ph+ e quase todos os doentes com leucemia mieloide crónica (LMC) de Ph+.

Todas as formas de proteínas de fusão BCR-ABL apresentam uma atividade aumentada e desregulada de tirosina quinase e a forma p190 demonstrou ter maior potencial de transformação do que a p210. Além disso, esta proteína quimérica parece desregular as vias normais de transdução de sinal dependentes de citoquinas, levando à inibição da apoptose ou ao crescimento independente do fator de crescimento.

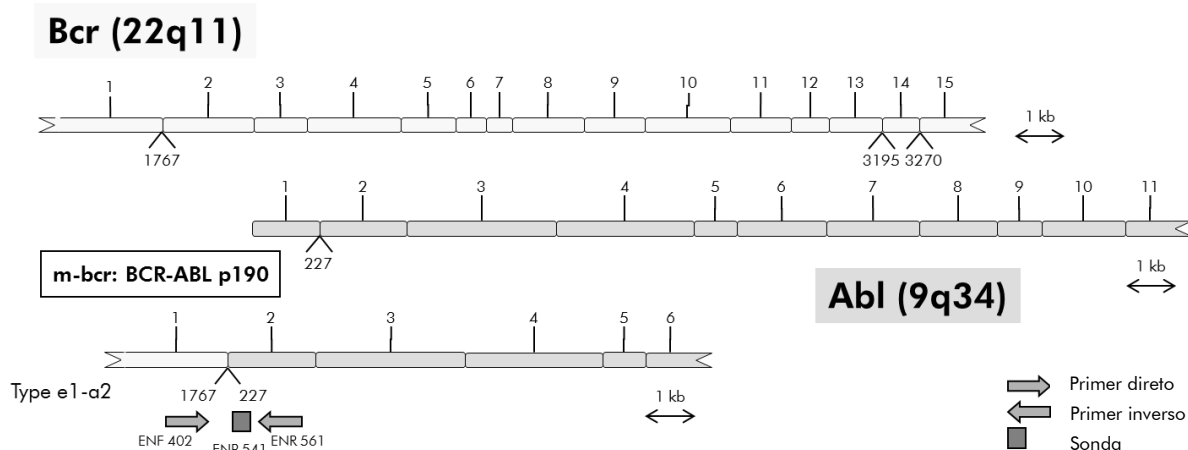


Figura 1: Diagrama esquemático da transcrição do gene de fusão BCR-ABL mbcr coberto pelos primers qPCR e conjunto da sonda: ENF402-ENP541-ENR561. O número sob os primers e sonda diz respeito à posição do seu nucleótido na transcrição do gene normal.

A terapia de doentes com LLA de Ph+ foi otimizada pela introdução de inibidores de tirosina quinase, que melhoraram significativamente a sobrevivência destes doentes (para revisão, ver referência 1). Para estes doentes, é necessária a monitorização da DRM. A metodologia atual para medir o nível de DRM implica a utilização da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), sendo que os números do transcrito BCR-ABL estão relacionados com números do transcrito de um gene de controlo (GC). O kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr baseia-se nesta técnica.

Princípio do procedimento

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 deteção 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'→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 de 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 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.

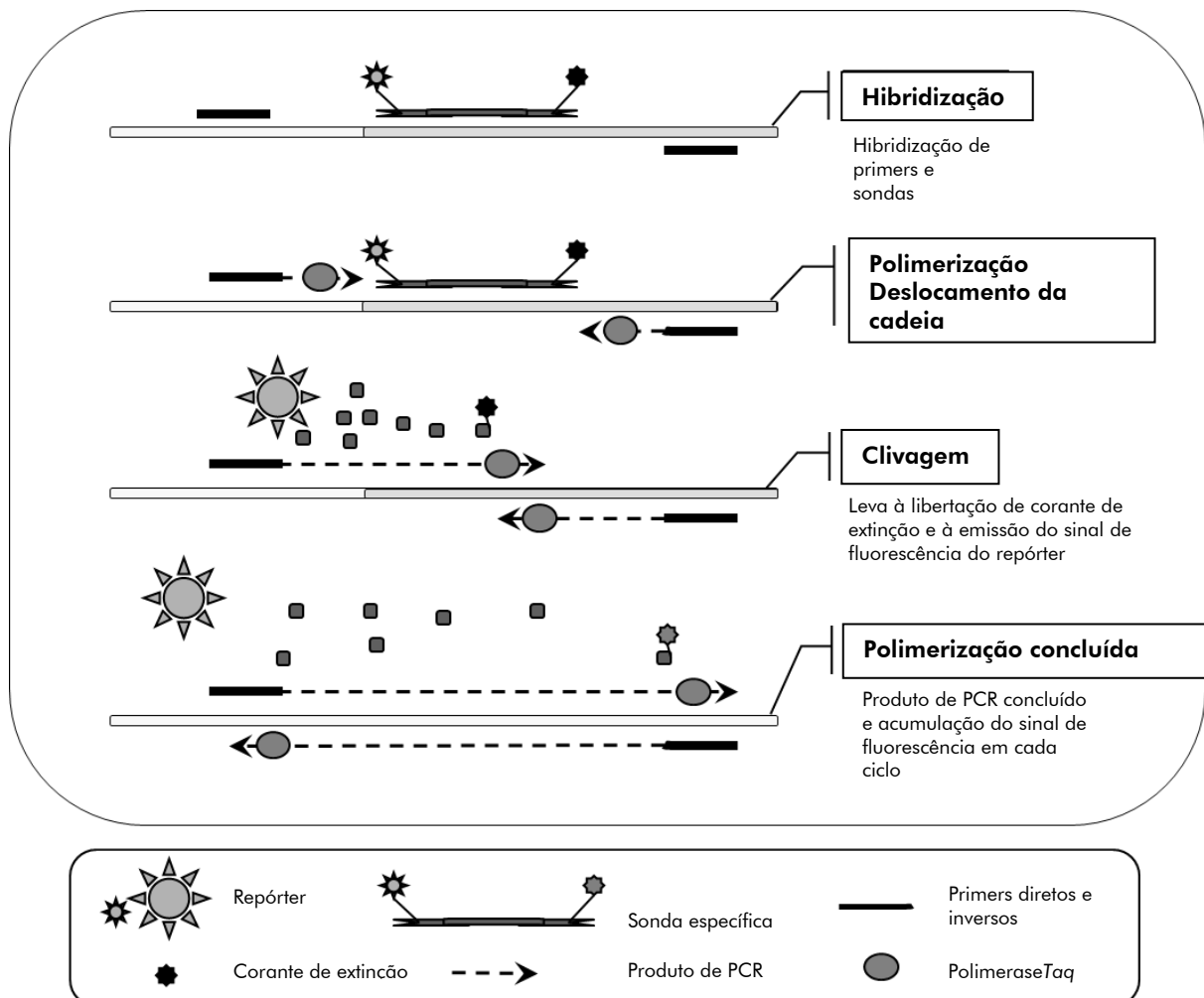


Figura 2: Princípio de reação. O ARN total é transcrito reversamente e o ADNc gerado é amplificado por PCR usando um par de primers específicos e uma sonda de duplo corante interna específica (FAM™–TAMRA™). A sonda liga-se ao amplicon durante cada passo de hibridização da PCR. Quando a Taq ADN polimerase 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 ADN polimerase *Taq*. 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 Kit		(24)
N.º de catálogo		670023
Número de reações		24
ABL Control Gene Standard Dilution (diluição do padrão do gene de controlo ABL) (10^3 cópias/5 μ l)	C1-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (diluição do padrão do gene de controlo ABL) (10^4 cópias/5 μ l)	C2-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (diluição do padrão do gene de controlo ABL) (10^5 cópias/5 μ l)	C3-ABL	50 μ l
BCR-ABL mbcR Fusion Gene Standard Dilution (diluição do padrão do gene de fusão BCR-ABL mbcR) (10^1 cópias/5 μ l)	F1-BCR-ABL e1a2 mbcR	50 μ l
BCR-ABL mbcR Fusion Gene Standard Dilution (diluição do padrão do gene de fusão BCR-ABL mbcR) (10^2 cópias/5 μ l)	F2-BCR-ABL e1a2 mbcR	50 μ l
BCR-ABL mbcR Fusion Gene Standard Dilution (diluição do padrão do gene de fusão BCR-ABL mbcR) (10^3 cópias/5 μ l)	F3-BCR-ABL e1a2 mbcR	50 μ l
BCR-ABL mbcR Fusion Gene Standard Dilution (diluição do padrão do gene de fusão BCR-ABL mbcR) (10^5 cópias/5 μ l)	F4-BCR-ABL e1a2 mbcR	50 μ l
BCR-ABL mbcR Fusion Gene Standard Dilution (diluição do padrão do gene de fusão BCR-ABL mbcR) (10^6 cópias/5 μ l)	F5-BCR-ABL e1a2 mbcR	50 μ l
Primers and Probe Mix ABL* (primers e mistura de sondas ABL)	PPC-ABL 25x	90 μ l
Primers and Probe Mix BCR-ABL mbcR Fusion Gene† (primers e mistura de sondas, gene de fusão BCR-ABL mbcR)	PPF-mbcR 25x	110 μ l

* 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 BCR-ABL mbcR mais uma sonda FAM-TAMRA específica.

ipsogen BCR-ABL1 mbcr Kit	(24)
N.º de catálogo	670023
Número de reações	24
ipsogen BCR-ABL1 mbcr Kit Handbook (inglês)	1

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.

Reagentes

- Água para uso em PCR sem nuclease
- 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)
- Inibidor de RNase: O reagente validado é RNaseOUT™ (Life Technologies, cat. n.º 10777-019)
- Conjunto de dNTPs, grau PCR
- Hexâmero aleatório
- MgCl₂
- 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

- 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

- Pipeta microlitro* 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, 2.0 ou 480; ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900HT SDS ou instrumento Smart Cyclor e material específico associado
- Termociclador* ou banho-maria* (passo de transcrição reversa)

Reagentes complementares

- Kit de controlos *ipsogen* BCR-ABL1 mbc (cat. n.º 670091), consistindo em linhas de células com expressão negativa, alta e positiva baixa do gene de fusão BCR-ABL mbc para a validação qualitativa da extração do ARN e a 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.

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 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.

- Minimize 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.

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

- 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. **Incube $1\ \mu\text{g}$ de ARN ($1\text{--}4\ \mu\text{l}$) 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 (μl)	Concentração final
Tampão de primeira cadeia (fornecido com SuperScript II Reverse Transcriptase), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ (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/ μ l)	0,5	1 U/ μ l
Hexâmero aleatório (100 μ M)	5,0	25 μ M
SuperScript II ou SuperScript Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	0,5	5 U/ μ l
Amostra de ARN aquecida (a acrescentar no passo 5)	1,0–4,0	50 ng/ μ l
Água para uso em PCR sem nuclease (a acrescentar no passo 5)	0,0–3,0	–
Volume final	20,0	–

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

Tabela 2: Preparação da reação de transcrição reversa

Componente	Volume (μl)
Mistura RT	16
Amostra de ARN aquecida (1 μ g)	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 μ l de água para uso em PCR sem nuclease, de forma a que o volume final seja de 50 μ l.
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 RotorGene 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

Amostras	Reações
Com os primers e misturas de sondas ABL (PPC-ABL)	
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
Com os primers e misturas de sondas BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)	
n amostras de ADNc	n x 2 reações
Padrão mbcr	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.

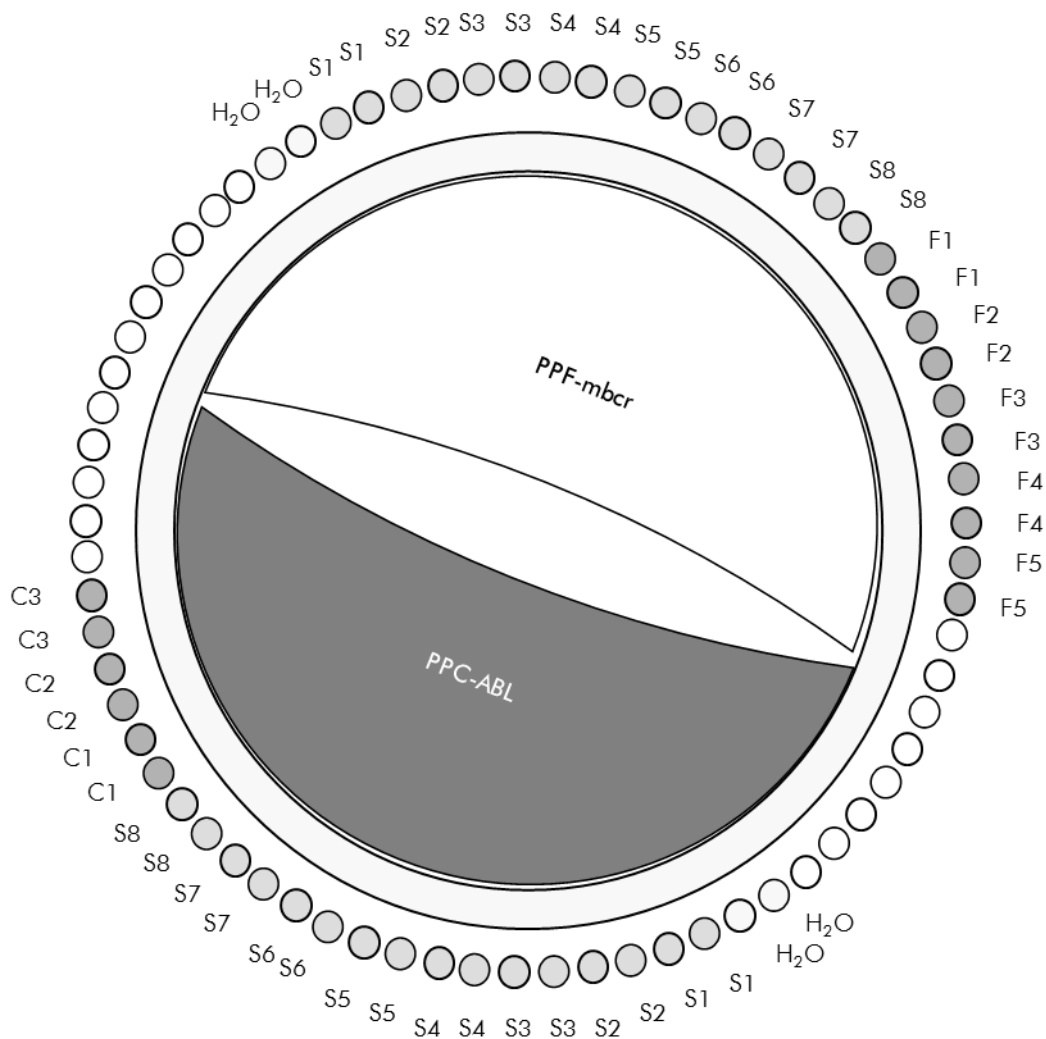


Figura 3: Configuração sugerida para rotor para cada ensaio com o kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr. F1–5: Padrões BCR-ABL mbcr; C1–3: Padrões ABL; S: Amostra de ADNc; H₂O: controle de água.

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. **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 o mesmo primer 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: 24+1 reações (μl)	BCR-ABL mbcr: 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 μ l da pré-mistura qPCR por tubo.**
- 4. Adicione 5 μ l do produto RT (ADNc, 100 ng, ARN equivalente) obtido na transcrição reversa (ver “Protocolo: transcrição reversa EAC normalizada recomendada”, página 14) no tubo correspondente (volume total 25 μ l).**
- 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

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

- 8. Para instrumentos Rotor-Gene Q, selecione "Slope Correct" para a análise. Recomendamos que o limiar seja definido para 0,03. Inicie o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 5.**

Protocolo: qPCR em instrumento ABI PRISM 7000, 7700 e 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.

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)	
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
Com os primers e misturas de sondas BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)	
n amostras de ADNc	n x 2 reações
Padrão mbcr	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 no instrumento 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.

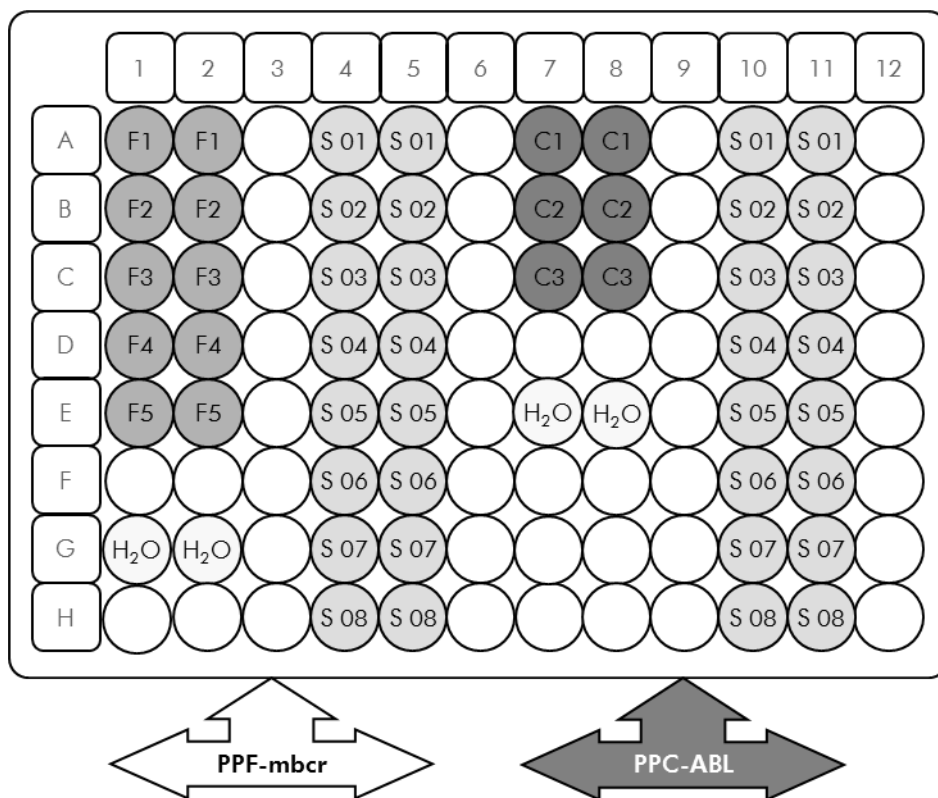


Figura 4: Configuração da placa sugerida para um ensaio. S: Amostra de ADNc; F1–5: Padrões BCR-ABL mbc; C1–3: Padrões ABL; H₂O: controlo de água.

qPCR em ABI PRISM 7000, 7700 e 7900 SDS e no instrumento 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. 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, 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 o mesmo primer e mistura de sondas (PPC-ABL ou PPF-mbcr). 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)	BCR-ABL mbcr: 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 μ l da pré-mistura qPCR por poço.
4. Adicione 5 μ l do produto RT (ADNc, 100 ng, ARN equivalente) obtido na transcrição reversa (ver “Protocolo: transcrição reversa EAC normalizada recomendada”, página 14) no poço correspondente (volume total 25 μ l).
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 ou na tabela 9 para o instrumento LightCycler 480.

Tabela 8: Perfil de temperatura para ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS

Modo de análise	Curvas-padrão — Quantificação absoluta
Hold	Temperatura: 50 °C Tempo: 2 min
Hold 2	Temperatura: 95 °C Tempo: 10 min
Cycling	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

Modo de análise	Quantificação absoluta ("Abs Quant")
Formatos de detecção	Selecione "Simple Probe" (amostra simples) na janela de formatos de detecção
Hold	Temperatura: 50 °C Tempo: 2 min
Hold 2	Temperatura: 95 °C Tempo: 10 min
Cycling	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, siga o passo 8a. Para o instrumento LightCycler 480, siga o passo 8b.**
- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS: Recomendamos que o limiar seja definido em 0,1, conforme descrito no protocolo EAC, no passo de análise, em ABI PRISM SDS e uma linha de base definida entre os**

ciclos 3 e 15. Inicie o programa de ciclagem da forma indicada na tabela 8.

8b. 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 9.

Protocolo: qPCR nos 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: Número de reações para instrumentos LightCycler 1.2 e 2.0

Amostras	Reações
Com os primers e misturas de sondas ABL (PPC-ABL)	
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
Com os primers e misturas de sondas BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)	
n amostras de ADNc	n x 2 reações
Padrão mbcr	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.

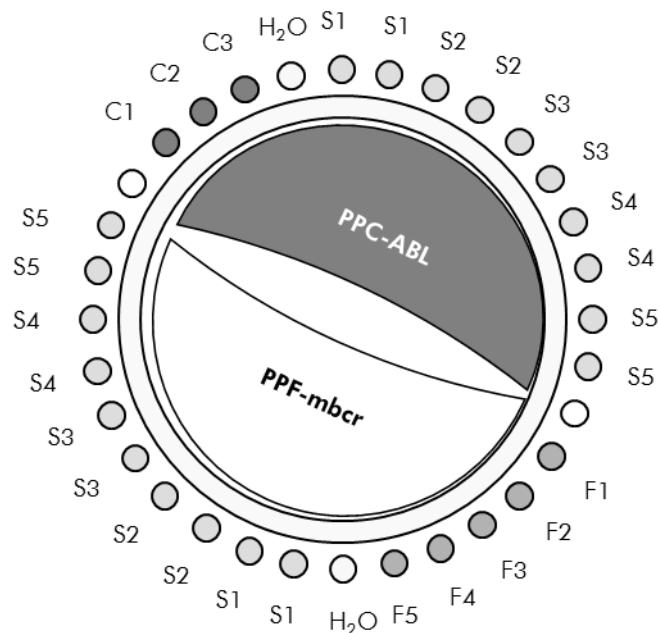


Figura 5: Configuração sugerida para rotor para cada ensaio com o kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr. F1–5: Padrões BCR-ABL mbcr; C1–3: Padrões ABL; S: amostra de ADN desconhecida a ser analisada; H₂O: controle de água.

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-mbcr). 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)	BCR-ABL mbr: 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 μ l da pré-mistura qPCR por capilar.
4. Adicione 5 μ l do produto RT (ADNc, 100 ng, ARN equivalente) obtido na transcrição reversa (ver “Protocolo: transcrição reversa EAC normalizada recomendada”, página 14) no tubo correspondente (volume total 20 μ l).
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

Modo de análise	Quantificação
Hold	Temperatura: 95 °C Tempo: 10 min Rampa: 20
Cycling	50 vezes 95 °C durante 10 segundos; rampa: 20 60 °C durante 1 minuto; rampa: 20; com aquisição de fluorescência da FAM: Single (simples)
Hold 2	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 “2nd 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

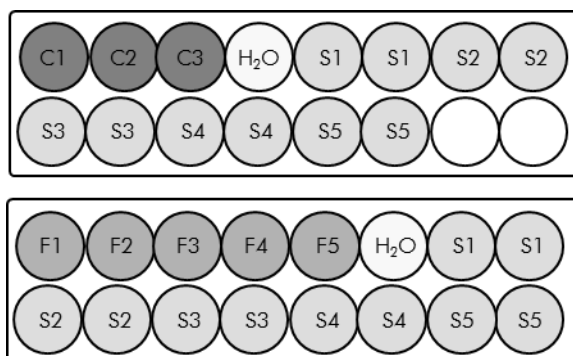
Utilizando este instrumento, recomendamos a medição das amostras e dos controlos em duplicado apenas uma vez, conforme indicado na tabela 13.

Tabela 13: Número de reações para o instrumento SmartCycler

Amostras	Reações
Com os primers e misturas de sondas ABL (PPC-ABL)	
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
Com os primers e misturas de sondas BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)	
n amostras de ADNc	n x 2 reações
Padrão mbcr	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-ABL.

Todos os ensaios no primeiro bloco são realizados com PPF-mbcr.

Figura 6: Configuração da placa sugerida para um ensaio. S: Amostra de ADNc; **F1-5:** Padrões BCR-ABL mbcr; **C1-3:** Padrões ABL; **H₂O:** 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 μ l. Pode ser preparada uma pré-mistura de acordo com o número de reações, usando o mesmo primer e mistura de sondas (PPC-ABL ou PPF-mbcr). São incluídos volumes extra para compensar erros de pipetagem.

Tabela 14: Preparação da mistura de qPCR

Componente	1 reação (μl)	ABL: 14+1 reações (μl)	BCR-ABL mbcr: 16+1 reações (μl)	Concentração final
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	–

3. **Distribua 20 μ l da pré-mistura qPCR por poço.**

4. Adicione 5 μ l do produto RT (ADNc, 100 ng, ARN equivalente) obtido na transcrição reversa (ver "Protocolo: transcrição reversa EAC normalizada recomendada", página 14) no tubo correspondente (volume total 25 μ l).
5. Misture cuidadosamente, pipetando para cima e para baixo.
6. Carregue as amostras no termociclador de acordo com as recomendações do fabricante.
7. Programe o instrumento SmartCycler com o programa de termociclagem, conforme indicado na tabela 15.

Tabela 15: Perfil de temperatura

Hold	Temperatura: 50 °C Tempo: 2 min
Hold 2	Temperatura: 95 °C Tempo: 10 min
Cycling	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 gene de controlo (GC) e 5 diluições do padrão para gene de fusão (GF) para garantir curvas-padrão precisas. As figuras 7 e 8 mostram um exemplo das curvas de amplificação TaqMan obtidas com o kit *ipsogen* BCR-ABL mbc.

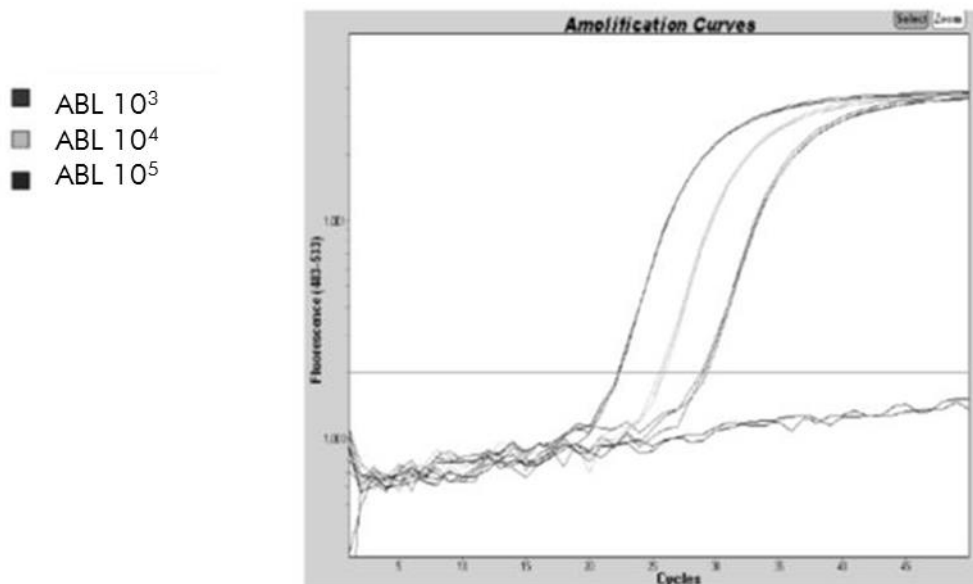


Figura 7: Detecção dos padrões ABL (C1, C2, C3). 10³, 10⁴ e 10⁵ cópias/5 μ l.

- m-bcr 10^1
- m-bcr 10^2
- m-bcr 10^3
- m-bcr 10^5
- m-bcr 10^6

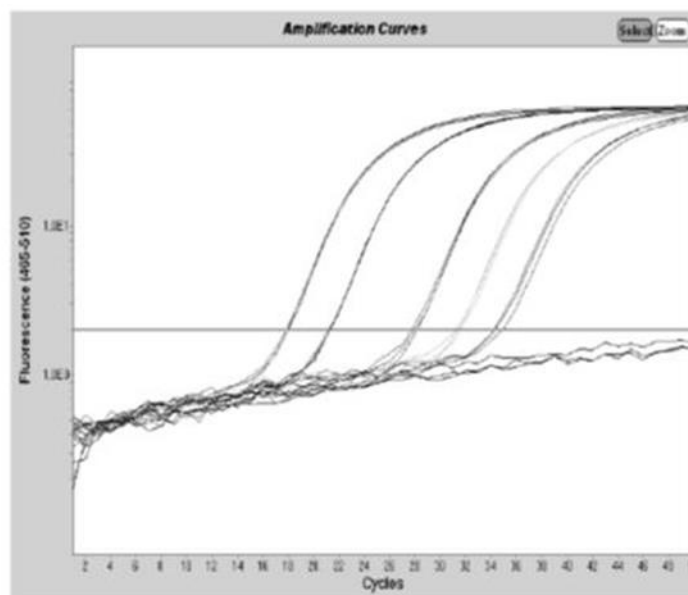


Figura 8: Detecção dos padrões BCR-ABL mbc (F1–F5). 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 cópias/ $5 \mu\text{l}$.

Resultados

Curva-padrão e critérios de qualidade

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 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.

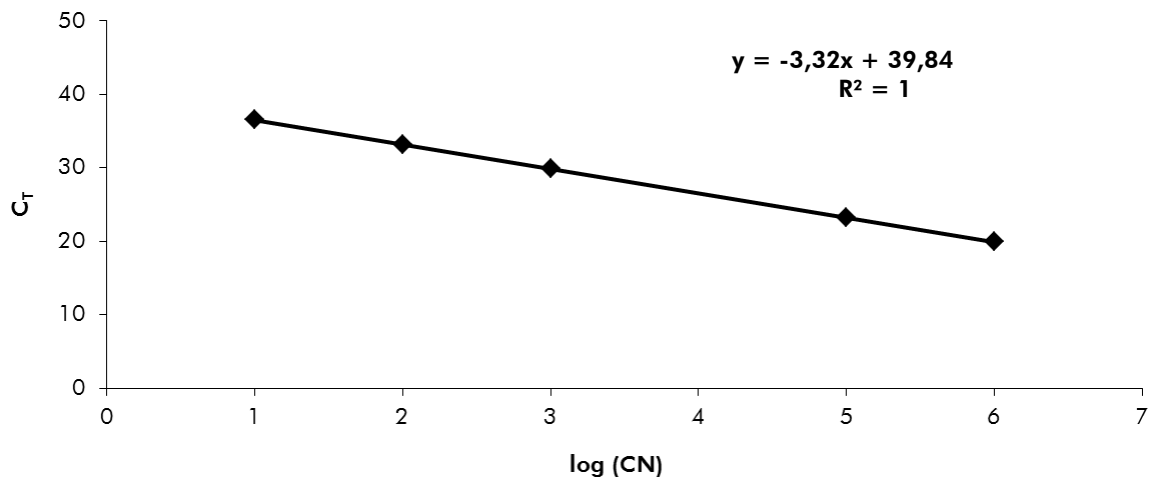


Figura 9: Curva teórica calculada a partir de 5 diluições do padrão. Uma curva de regressão linear ($y = ax + b$) é calculada para cada gene (ABL e BCR-ABL), sendo que a é o declive da linha e b é a intersecção y , que é a coordenada y do ponto em que a linha cruza o eixo y . A sua equação e coeficiente 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 $>0,95$ (2). Contudo, é desejável um valor para $R^2 >0,98$ para resultados precisos (3).

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 os valores C_T em bruto (obtidos com PPF-mbcr) para as amostras desconhecidas em números de cópias BCR-ABL ($BCR-ABL_{mbcr_{CN}}$).

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

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

Valor DRM

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

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

Sensibilidade

A sensibilidade (SENS_v) é calculada de acordo com a expressão relativa do gene de fusão na amostra de diagnóstico (GF_{CN}/GC_{CN})_{DX} e a expressão do gene de controlo ($GC_{CN,FUP}$) na amostra de acompanhamento.

$$\text{Sensibilidade (SENS}_v\text{)} = \frac{GC_{CN,DX}}{GC_{CN,FUP} \times GF_{CN,DX}}$$

Controlo da qualidade nos valores ABL

Má qualidade do ARN ou problemas durante os passos qPCR resulta em ABL_{CN} baixo. Recomendamos que se descartem os resultados das amostras que derem ABL_{CN} < 1318 (valor inferior do CI 95% de amostras de doentes no estudo EAC, referência 4).

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 (2).

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 obter mais informações, consulte também 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 48).

Comentários e sugestões

Resultado negativo para o gene de controlo (ABL) e BCR-ABL mbcr em todas as amostras — padrão OK

- a) Má qualidade do ARN Verifique sempre a qualidade do ARN e a concentração antes de começar.
Corra um controlo ARN positivo da linha de células (controlo positivo elevado no kit de controlos *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr, cat. n.º 670091) em paralelo.
- b) Insucesso do passo de transcrição reversa Verifique sempre a qualidade do ARN e a concentração antes de começar.
Corra um controlo ARN positivo da linha de células (kit de controlos *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr, cat. n.º 670091) 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.
Corra um controlo ARN positivo da linha de células (kit de controlos *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr, cat. n.º 670091) em paralelo.
- b) Insucesso do passo de transcrição reversa Verifique sempre a qualidade do ARN e a concentração antes de começar.
Corra um controlo ARN positivo da linha de células (kit de controlos *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr, cat. n.º 670091) em paralelo.

Sinal do padrão negativo

- a) Erro de pipetagem Verifique o esquema de pipetagem e a configuração da reação.
Repita a corrida da PCR.
- b) Armazenamento inapropriado dos componentes do kit Guarde o kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr 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 12.
Evite congelar e descongelar repetidamente.
Reagentes de alíquotas para armazenamento.

Comentários e sugestões

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.
- 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.
- d) LightCycler: sem aquisição de dados programada Verifique os programas de ciclo.
- Selecione o modo de aquisição "single" (simple) no final de cada segmento de hibridização do programa PCR.

Comentários e sugestões

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

- a) Qualidade de ARN fraca ou concentração baixa
- Verifique sempre a qualidade do ARN e a concentração antes de começar.
- Corra um controlo ARN positivo da linha de células (kit de controlos *ipsogen* BCR-ABL1 mbc, cat. n.º 670091) em paralelo.
- b) Insucesso do passo de transcrição reversa
- Verifique sempre a qualidade do ARN e a concentração antes de começar.
- Corra um controlo ARN positivo da linha de células (kit de controlos *ipsogen* BCR-ABL1 mbc, cat. n.º 670091) em paralelo.

Intensidade da fluorescência demasiado baixa

- a) Armazenamento inapropriado dos componentes do kit
- Guarde o kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbc 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 12.
- Evite congelar e descongelar repetidamente.
- Reagentes de alíquotas para armazenamento.
- b) Quantidade inicial muito baixa de ARN alvo
- Aumente a quantidade da amostra de ARN.
- Nota:** 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.
- 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.
- Centrifugue sempre os capilares carregados com mistura de reação, conforme descrito no manual de funcionamento específico do instrumento.

Comentários e sugestões

- 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.

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/.

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) (4), e está em conformidade com as recomendações internacionais atualizadas (3, 5). Deve ser utilizado observando as instruções constantes deste manual em combinação com reagentes e instrumentos validados (ver “Materiais necessários, mas não fornecidos”, página 10). 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 10. Estudos de equivalência validaram a sua utilização nos seguintes instrumentos: ABI PRISM 7000 e 7900HT SDS, instrumentos LightCycler 1.2 e 480, Rotor

Os estudos não clínicos foram conduzidos para estabelecer o desempenho analítico do kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbc. Estes estudos de laboratório não clínicos foram realizados em ARN total da linha de células TOM1 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 TOM1 (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg e 0,5 pg) diluídas em ARN total MV4-11, numa quantidade total final constante de 1000 ng, em 5 replicados por corrida e em 4 corridas diferentes (figura 10).

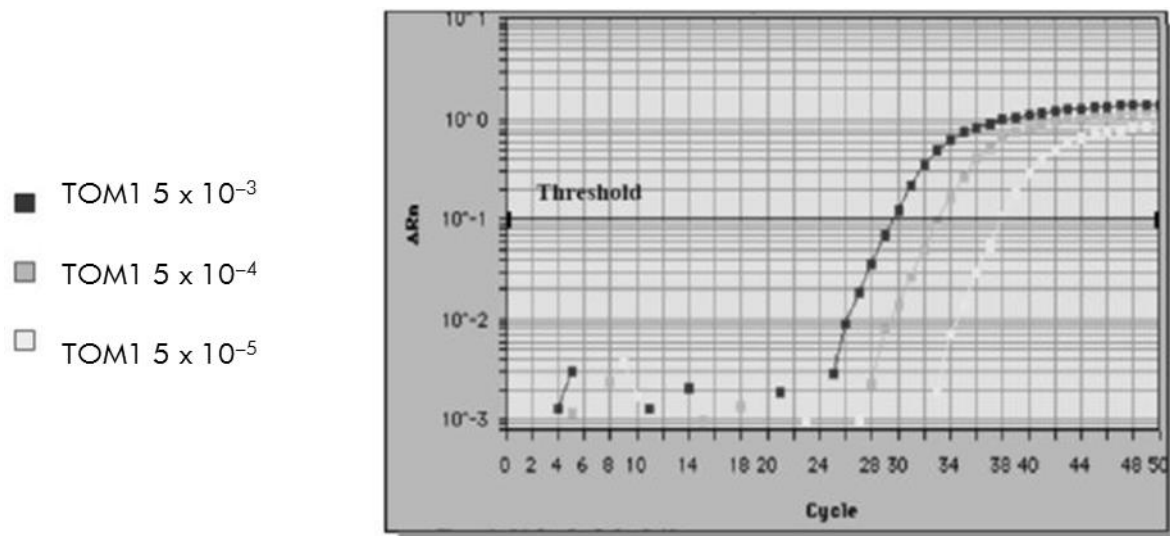


Figura 10: Gráficos de amplificação de 5 x 10⁻³ (5 ng), 5 x 10⁻⁴ (0,5 ng) e 5 x 10⁻⁵ (0,05 ng) diluições de ARN total de TOM1 em ARN total negativo MV4-11.

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: Análise inter-ensaio — linhas de células mbcr e ABL

Linha de células	Diluição	C _T médio	SD	n	CV (%)
mbcr	5 x 10 ⁻³ (5 ng/1 µg)	29,19	0,26	20	0,88
	5 x 10 ⁻⁴ (0,5 ng/1 µg)	33,70	0,48	20	1,47
	5 x 10 ⁻⁵ (0,05 ng/1 µg)	37,03	1,16	20	3,15
ABL	–	25,01	0,87	100	3,46

Tabela 17: Análise inter-ensaio — plasmídeos

Gene	Plasmídeo	C _T médio	SD	n	CV (%)
mbcr	F1 (10 ¹ cópias)	35,19	0,90	11	2,57
	F2 (10 ² cópias)	31,87	0,64	12	1,99
	F3 (10 ³ cópias)	28,41	0,71	12	2,50
	F4 (10 ⁵ cópias)	21,48	0,59	12	2,76
	F5 (10 ⁶ cópias)	18,37	0,71	12	3,89
ABL	C1 (10 ³ cópias)	29,68	0,85	12	2,86
	C2 (10 ⁴ cópias)	26,01	0,51	12	1,96
	C3 (10 ⁵ cópias)	22,53	0,42	12	1,86

Tabela 18: Análise inter-ensaio — linhas de células BCR-ABL mbcr e ABL (CN médio)

Linha de células	Diluição	CN médio	SD	n	CV (%)
BCR-ABL mbcr	5 x 10 ⁻³ (5 ng/1 µg)	587,30	194,10	20	33,05
	5 x 10 ⁻⁴ (0,5 ng/1 µg)	57,84	20,38	20	35,23
	5 x 10 ⁻⁵ (0,05 ng/1 µg)	4,39	2,73	20	62,35
ABL	–	22.038,22	9459,17	100	42,92

Tabela 19: Análise inter-ensaio — linha de células BCR-ABL mbcr (NCN médio)

Linha de células	Diluição	NCN* médio	SD	N	CV (%)
BCR-ABL mbcr	5 x 10 ⁻³ (5 ng/1 µg)	267,46	93,22	20	34,85
	5 x 10 ⁻⁴ (0,5 ng/1 µg)	23,54	7,36	20	31,28
	5 x 10 ⁻⁵ (0,05 ng/1 µg)	2,60	2,80	20	107,66

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

Estudos clínicos

Avaliação do desempenho realizada num ABI PRISM 7700 SDS, em combinação com reagentes listados em “Materiais necessários, mas não fornecidos”, página 10. Estudos de equivalência validaram a sua utilização nos seguintes instrumentos: ABI PRISM 7000 e 7900HT SDS, instrumentos LightCycler 1.2 e 480, Rotor

Um grupo de 26 laboratórios em 10 países europeus, organizados numa ação concertada da Europa contra o Cancro (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 BCR-ABL p190 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, 7).

Reprodutibilidade interlaboratorial para os padrões de plasmídeo GC e GF

Onze 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 _T SD	CV (%)
Gene de controlo ABL	C1	29,04	0,53	1,82
	C2	25,64	0,47	1,84
	C3	22,10	0,34	1,55
Gene de fusão BCR-ABL mbc	F1	35,99	1,18	3,28
	F2	32,05	0,74	2,32
	F3	28,43	0,65	2,29
	F4	21,60	0,59	2,72
	F5	18,24	0,46	2,57

Valores de expressão da transcrição do gene de fusão BCR-ABL mbc

As tabelas 21 e 22 mostram os valores de expressão da transcrição do gene de fusão BCR-ABL mbc e de GC ABL, para a linha de células TOM1, doentes com LLA no diagnóstico e doentes normais.

Tabela 21: Valores de expressão da transcrição do gene de fusão (GF) BCR-ABL mbcr e valores C_T do gene de controlo (GC) ABL

	Valores C _T (intervalo de 95%)	
	BCR-ABL mbcr	ABL
Linha de células TOM1	22,8	21,8
Amostras de doentes com LLA		
BM (n = 17)	24,7 (21,3–27,1)	24,5 (21,7–27,1)
PB (n = 7)	23,3 (21,7–29,1)	22,5 (21,0–27,0)
Amostras de doentes negativos		
BM (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
PB (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

Tabela 22: Valores de expressão da transcrição do gene de fusão (GF) BCR-ABL mbcr e valores CN e NCN do gene de controlo (GC) ABL

	Valores CN (intervalo de 95%)		Valores NCN (intervalo de 95%)
	BCR-ABL mbcr	ABL	CN BCR-ABL mbcr/CN ABL
Amostras de doentes com LLA			
BM (n = 17)	9550 (1738–97.724)	11 912 (5012–70.795)	0,8 (0,35–1,38)
PB (n = 7)	91 201 (1905–208.930)	134 896 (4786–114.815)	0,68 (0,4–1,82)
Amostras de doentes negativos			
BM (n = 26)	–	19.201 (12.922–25.480)	–
PB (n = 74)	–	21.136 (17.834–24.437)	–

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 leucemia (LLA, LMA, LMC).

Taxas de falsos positivos e falsos negativos

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

- Controlos positivos: células TOM1, uma linha de células bem conhecida pela sua positividade para o gene de fusão BCR-ABL p190; amostras de doentes já avaliadas quanto a positividade p190
- 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: Amostras falsas negativas e falsas positivas

Falsa negatividade		Falsa positividade	
10^{-3}	10^{-4}	Controlo GF negativo	NAC/NTC
0% (0/54)	4% (3/75)	4,8% (6/126)	5,8% (7/120)

Referências

A QIAGEN mantém uma abrangente base de dados online atualizada de publicações científicas que utilizam produtos QIAGEN. As opções de pesquisa avançada permitem localizar os artigos necessários, quer através da pesquisa por uma única palavra-chave, quer especificando a aplicação, área de investigação, título, etc.

Para obter uma lista completa de referências, visite a base de dados de referências da QIAGEN online em www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou contacte a Assistência Técnica ou o distribuidor local da QIAGEN.

Referências citadas

1. Thomas, D.A. (2007) Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukemia: a new era of challenges. Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program **2007**, 435.
2. 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.
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. 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.
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. Silvy, M., Mancini, J., Thirion, X., Sigaux, F., and Gabert, J. (2005) Evaluation of real-time quantitative PCR machines for the monitoring of fusion gene transcripts using the Europe against cancer protocol. Leukemia **19**, 305.
7. 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

LOT

Número do lote

MAT

Número do material

GTIN

Número do item de comércio mundial



Limites de temperatura



Fabricante



Consultar 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 mbc Kit (24)	Para 24 reações: Padrões de gene de controlo ABL, padrões de gene de fusão BCR-ABL mbc, primer e mistura de sondas ABL, primer e mistura de sondas do gene de fusão BCR-ABL mbc	670023
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> BCR-ABL1 mbc Controls Kit — para a validação qualitativa da extração do ARN e a transcrição reversa do gene de fusão BCR-ABL mbc		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbc Controls Kit	Linhas de células com expressão negativa, alta e positiva baixa do gene de fusão BCR-ABL mbc	670091

Para informações atualizadas sobre licenciamento e limitações de responsabilidade específicas do produto, consulte o respetivo 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.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

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

Acordo de licença limitada

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

1. O kit *ipsogen* BCR-ABL1 *mbc* pode ser usado somente em conformidade com o *Manual do kit ipsogen BCR-ABL1 mbc* 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 mbc* 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-1357-002 © 2013–2015 QIAGEN. Todos os direitos reservados.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

