

Juni 2018

# *ipsogen*<sup>®</sup> BCR-ABL1 MbcR RGGQ RT-PCR Kit-handbok



Version 1

**IVD**

Kvantitativ in vitro-diagnostisk

För användning med instrumentet Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM

**CE**

**REF**

670923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
Tyskland

R4

**MAT**

1114278SV

# Innehåll

Avsedd användning .....	5
Sammanfattning och förklaring .....	5
Om kronisk myeloisk leukemi .....	5
Sjukdomsövervakning .....	6
Testprincip .....	8
Material som medföljer .....	11
Kitinnehåll .....	11
Material som behövs men inte medföljer .....	12
Varningar och försiktighet .....	15
Säkerhetsinformation .....	15
Allmänna säkerhetsåtgärder .....	15
Förvaring och hantering av reagens .....	17
Leveransvillkor .....	17
Förvaring .....	17
Stabilitet .....	18
Förvaring och hantering av prover .....	18
Helblodsprover .....	18
RNA-prover .....	19
Procedur .....	20
Erythrocytlyseringsprotokoll för isolering av totalt antal leukocyter från helblod .....	20
Isolering av total mängd RNA .....	22
Kvalificering och kvantifiering av RNA .....	25

RNA-koncentration.....	25
Omvänd transkription .....	28
Manuell analys: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med rotor med 72-rör och RGQ-programvara.....	31
Automatiserad analys: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med rotor med 72 rör och RGAM-programvara.....	37
Tolkning av resultat på RGQ-programvaran .....	48
Princip för dataanalys .....	48
Standardkurvor och kvalitetskriterier som kan tillämpas på rådata.....	49
Tolkning av resultat på RGAM-programvaran.....	57
Felsökningshandbok.....	64
Kvalitetskontroll .....	66
Begränsningar.....	66
Prestandaegenskaper .....	68
LOB (limit of blank).....	68
Detektionsgräns (LOD).....	68
Linjäritet .....	68
Repeterbarhet och reproducerbarhet.....	69
Interfererande substanser.....	69
Klinisk utvärdering och metodjämförelse.....	70
Studie av överensstämmelse: ERM-AD623 BCR-ABL1-enkelplasmidstandard (IRMM) jämfört med <i>ipsogen</i> -enkelplasmidstandard (QIAGEN) .....	72
Referenser.....	74
Symboler .....	76
Beställningsinformation.....	77

---

Dokumentrevisjoner.....	79
-------------------------	----

# Avsedd användning

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit är ett kvantitativt in vitro-diagnostiskt test för att mäta transkript av BCR-ABL1-fusionsgenen b3a2 (e14a2) och b2a2 (e13a2) i total mängd RNA som extraherats från helblod.

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit är avsett att övervaka djup molekylär respons hos patienter som diagnostiserats med kronisk Philadelphiakromosompositiv (Ph+) myeloisk leukemi (CML) med p210.

Det har kalibrerats efter WHO:s International Genetic Reference Panel.

## Sammanfattning och förklaring

### Om kronisk myeloisk leukemi

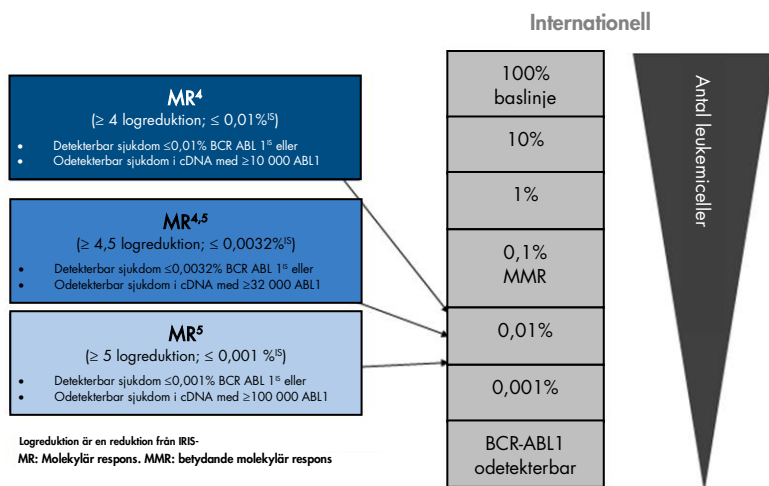
KML tillhör gruppen myeloproliferativa neoplasmer och visas i > 90 % av fallen genom närvaro av Philadelphia-kromosomen. Kromosomen är produkten av en reciprok translokation mellan de långa armarna hos kromosom 9 och 22, t(9;22), med BCR på kromosom 22 och c-ABL-onkogenen på kromosom 9. Den motsvarande fusionsgenen, BCR-ABL1, transkriberas till 8,5 kb mRNA med 2 varianter: b2a2 (förekommer i 40 % av fallen) och b3a2 (förekommer i 55 % av fallen). Fusionsgenen avkodar ett chimärt protein, p210, med förhöjd tyrosinkinasaktivitet. Transkripten b2a3 och b3a3 utgör mindre än 5 % av fallen. En Ph-kromosom kan också detekteras hos 35 % av vuxna patienter med akut lymfatisk leukemi (ALL).

---

Den årliga incidensen för KML är omkring 1–2 per 100 000, och KML utgör 20 % av all leukemi hos vuxna. KML karaktäriseras kliniskt genom ett överskott av myeloida celler med normal differentiering och funktion. I 90–95 % av KML-fallen diagnostiseras patienten under sjukdomens kroniska eller stabila fas. Tidigare utvecklade patienten blastkris och akut leukemi med dödlig utgång inom i genomsnitt 4 till 6 år. Med lanseringen av imatinib, och därefter framtagandet av andra generationens tyrosinkinashämmare (tyrosine kinase inhibitors, TKI), har dock sjukdomens naturliga förlopp kunnat förändras dramatiskt. De flesta patienter stannar numera i remission och kräver därmed uppföljning och sjukdomsövervakning under en längre tid.

## Sjukdomsövervakning

KML-behandlingens nuvarande mål är att uppnå 100 % överlevnad och Ph-kromosom-negativitet. Sjukdomsövervakning är därför en mycket viktig metod för att bedöma svar på behandling och upptäcka återfall hos patienten så tidigt som möjligt. När patienten behandlas med tyrosinkinashämmare (TKI) går utvecklingen vanligtvis från hematologisk via cytogenetisk till molekylär remission, med motsvarande minskning av leukemiceller och BCR-ABL1-transkript enligt Figur 1.



**Figur 1. Definition av molekylär respons.** Framtagen från referenserna 1, 2 och 9. **MR, molecular response:** molekylär respons. **MMR, major molecular response:** betydande molekylär respons.

Referensmetoden för att uppskatta tumörbördan hos KML-patienter är konventionell cytogenetisk analys (G-bandning) av metafaser i benmärg (bone marrow, BM). Cytogenetiskt svar bedöms på minst 20 metafaser i benmärg. Nivån för cytogenetisk respons uppskattas utifrån procentandelen Ph-kromosompositiva metafaser (3). Bedömningen påverkas dock av laboratoriets egenskaper och expertis och har en låg sensitivitet: 5 % vid analys av 20 metafaser.

Kvantifiering av BCR-ABL1 Mbc mRNA på prover med perifert blod (PB) genom kvantitativ polymeraskedjereaktion (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) i realtid definierar den molekylära responsen, och är numera en del av de sjukdomsövervakningsmetoder som används vid KML. Den är mindre invasiv än konventionell cytogenetik av metafaser i benmärg och mer sensitiv.

Rekommendationerna för sjukdomsövervakning av KML har också nyligen uppdaterats så att de tar hänsyn till nya kliniska resultat från läkemedelsundersökningar, den högre kliniska

effekten från andra generationens TKI och förbättrade BCR-ABL1-kvantifieringsmetoder, vilka alla leder till förbättrade övervakningsmöjligheter. Närmare bestämt leder andra generationens TKI till en mer signifikant molekyllär respons hos ett stort antal KML-patienter. Man uppnår därmed vad som kallas en betydande molekyllär respons, vilket motsvarar ett BCR-ABL1-värde under 0,01 % (MR4,0) eller 0,0032 % (MR4,5). Korrekt kvantifiering av de mycket låga nivåerna BCR-ABL1 har klinisk relevans, eftersom observationsstudier har visat att TKI-behandling kan avbrytas utan risk hos patienter med en ihållande MR4,5-molekyllär respons (4). Det pågår dock ytterligare kliniska prövningar för att bekräfta resultaten.

De senaste rekommendationerna för responsdefiniering och övervakning av KML-patienter som använder TKI kommer från experter inom ELN (3).

På det tekniska området har internationella experter satsat på att harmonisera BCR-ABL1 Mbcrtestning och -rapportering (5–7). Dessutom har en referenspanel nyligen utvärderats i WHO:s regi, som ska göra det möjligt med en enkel standardisering av BCR-ABL1-kvantifiering (8).

## Testprincip

qPCR möjliggör korrekt kvantifiering av PCR-produkter under den exponentiella fasen av PCR-amplifieringsprocessen. qPCR-data kan erhållas snabbt, utan bearbetning efter PCR, genom realtidsdetektion av fluorescenssignaler under och/eller efter PCR-cykling, vilket därmed avsevärt minskar risken för PCR-kontaminering. För närvarande finns 3 tillgängliga huvudtyper av qPCR-teknik: qPCR-analys med SYBR® Green I-färg, qPCR-analys med hydrolysprober och qPCR-analys med hybridiseringsprober.

I den här analysen används principen qPCR-oligonukleotidhydrolys med dubbel färgning. Under PCR hybridiseras forward- och reverse-primrar till en specifik sekvens. En dubbelfärgad oligonukleotid ingår i samma mix. Den här proben, som består av en oligonukleotid märkt med en 5'-reporterfärg och en nedströms 3'-quencherfärg, hybridiserar till en målsekvens inom PCR-produkten. qPCR-analysen med hydrolysprober utnyttjar 5'→3'-exonukleas-aktiviteten

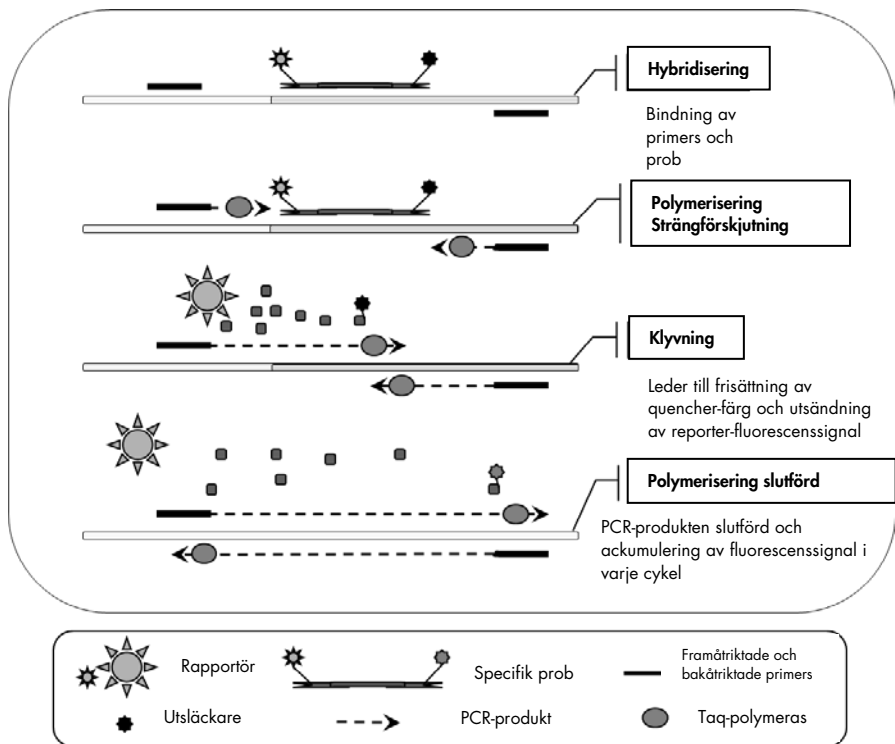


---

i *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA-polymeraset. När proben är intakt fluorescerar inte reporterfärgen så länge reporterfärgen och quencherfärgen är i närheten av varandra, vilket främst uppnås genom energiöverföring av Förster-typ.

Om målobjektet är närvarande under PCR hybridiserar proben specifikt mellan forward- och reverse-primerplatserna. DNA-polymerasets 5'→3'-exonukleasaktivitet gör att sökfragmentet klyvs mellan reporter och quencher, men endast om sökfragmentet hybridiserar till målet. Probfragmenten förskjuts från target och polymeriseringen av strängen fortsätter. Probens 3'-ände blockeras för att förhindra att proben förlängs under PCR (Figur 2). Den här processen uppstår i varje cykel och interfererar inte med den exponentiella ackumuleringen av produkten.

Ökningen av fluorescenssignalen detekteras bara om målsekvensen är komplementär till proben och därför amplifieras under PCR. På grund av de här tre kraven detekteras inte icke-specifik amplifiering. Sålunda är ökningen av fluorescensen direkt proportionell mot målampliciferingen under PCR.



**Figur 2. Reaktionsprincip.** Totalt RNA transkriberas omvänt, och det framställda cDNA:t amplificeras med PCR med hjälp av ett par specifika primers och ett specifikt internt dubbelfärg-sökfragment (FAM™-BHQ<sup>®</sup>-1). Proben binder till amplikonet under varje hybridiseringssteg i PCR. När *Taq* förlängs från den primer som är bunden till amplikonet förskjuts probens 5'-ände, vilken därefter försämras av 5'→3'-exonukleas-aktiviteten i *Taq* DNA-polymeraset. Klyvningen fortsätter tills den återstående proben smälter från amplikonet. Denna process frisätter fluoroforen och quencheren i lösning, vilket skiljer dem åt spatialt och leder till en ökad fluorescens från FAM och en minskad fluorescens från BHQ-1.

# Material som medföljer

## Kitinnehåll

<b>ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Katalognr.</b>		<b>670923</b>
<b>Antal reaktioner</b>		<b>24</b>
<b>Reagents for reverse transcription (Reagenser för omvänd transkription) (RT)</b>		24 µl
Reverse transcriptase (Omvänt transkriptas)	Lila	100 µl
RT Mix (RT-mix)	Lila	300 µl
<b>Reagenser för kalibrering</b>		
High Positive RNA Control (högpositiv RNA-kontroll)	Vit	15 µl × 3
Low Positive RNA Control (lågpositiv RNA-kontroll)	Vit	15 µl × 3
IS-MMR Calibrator (IS-MMR-kalibrator)	Vit	15 µl × 3
SP1-BCR-ABL1 MbcR and ABL1: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 <sup>1</sup> kopior/5 µl)	Gul	35 µl
SP2-BCR-ABL1 MbcR and ABL1: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 <sup>2</sup> kopior/5 µl)	Gul	35 µl
SP3-BCR-ABL1 MbcR and ABL1: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 <sup>3</sup> kopior/5 µl)	Gul	70 µl
SP4-BCR-ABL1 MbcR and ABL1: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 <sup>4</sup> kopior/5 µl)	Gul	35 µl
SP5-BCR-ABL1 MbcR and ABL1: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 <sup>5</sup> kopior/5 µl)	Gul	70 µl
SP6-BCR-ABL1 MbcR and ABL1: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 <sup>6</sup> kopior/5 µl)	Gul	70 µl

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Reagenser för qPCR		
Taq DNA polymerase (Taq DNA-polymeras)	Mint	85 µl
qPCR Mix ABL1 (qPCR-mix ABL1)*	Grön	720 µl × 3
qPCR Mix Mbcr (qPCR-mix Mbcr)†	Röd	720 µl × 3
ipsogen BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR handbok		1

\* Innehåller en mix av specifika reverse- och forward-primrar för ABL1-kontrollgenen plus en specifik FAM-BHQ1-prob.

† Innehåller en mix av specifika reverse- och forward-primrar för BCR-ABL1 Mbcr-fusionsgenen plus en specifik FAM-BHQ1-prob.

## Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

### Reagenser för erythrocytlysning

- Erythrocyte Lysis (EL) Buffer (Erythrocytlyseringsbuffert) (EL) (kat.nr 79217)
- 14,3 M β-merkaptoetanol\*
- RNeasy® Midi Kit (kat.nr 75144)

\* De kemikalier och den utrustning som rekommenderas för erythrocytlysning och RNA-isolering är potentiellt farliga. Säkerställ att personalen bär lämplig skyddsutrustning och att skyddsåtgärder vidtas före användning.

## Reagenser för isolering av den totala mängden RNA

- RNeasy Midi Kit (kat.nr 75144)
- Etanol (70 %, 80 % och 96–100 %)
- RNA-rengöring och -koncentration: RNeasy MinElute® Cleanup Kit (kat.nr 74204)
- Nukleasfritt vatten (PCR-grade)

## Förbrukningsartiklar

- Nukleasfria aerosolresistenta sterila PCR-pipettspetsar med hydrofobiskt filter
- Nål\* 18–20 gauge som sitter i en RNase-fri spruta
- 0,5 ml eller 0,2 ml nukleasfria rör
- 1,5 ml eller 2 ml nukleasfria rör
- 50 ml centrifugrör
- Strip Tubes and Caps 0.1 ml för the Rotor-Gene Q (kat.nr 981103 eller 981106)
- Is

## Utrustning

- Pipetter\* avsedda för PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1 000 µl)
- Bänkcentrifug\* med rotor för 0,2 ml och 2 ml reaktionsrör (med kapacitet för 8 000 × g eller 10 000 rpm)
- Spektrofotometer\*
- Laborariecentrifug\* med rotor för 15 och 50 ml centrifugrör (med kapacitet för 3 000–5 000 × g) som tillåter kylcentrifugering (4 °C)

\* Säkerställ att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens rekommendationer.

- Termomixer, uppvärmd skakinkubator, värmeblock eller vattenbad (för processen omvänd transkription)\*
  - Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM\* (kat.nr 9002032) och tillhörande instrumentspecifikt material
- Obs:** Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM kan inte användas för processen omvänd transkription.

## Utrustning för qPCR med manuell analys

### Programmet Rotor-Gene Q, version 2.1.0 eller högre Utrustning för qPCR med automatiserad analys

- Programmet Rotor-Gene AssayManager® version 2.1.x ( $x \geq 0$ )
- Plugin-programmet Rotor-Gene AssayManager Gamma v1.0.x ( $x \geq 0$ )
- Analysprofilen ipsogen\_BCR-ABL1Mbc(ABL)\_blood\_CE\_V1\_0\_x.iap ( $x \geq 1$ )

# Varningar och försiktighet

För in vitro-diagnostisk användning

## Säkerhetsinformation

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS). Dessa är tillgängliga online i praktiskt och kompakt PDF-format på [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) där du kan hitta, granska och skriva ut datablad för alla kit och kitkomponenter från QIAGEN®.

Alla kemikalier och allt biologiskt material är potentiellt farliga. Prover är potentiellt smittsamma och måste hanteras som smittfarligt material. Blod anses vara potentiellt smittfarligt. Vid hantering av helblod måste alla nödvändiga åtgärder som rekommenderas av de nationella tillsynsmyndigheterna vidtas.

De kemikalier och den utrustning som rekommenderas för erythrocytlysering och RNA-isolering är potentiellt farliga. Säkerställ att personalen bär lämplig skyddsutrustning och att skyddsåtgärder vidtas före användning.

## Allmänna säkerhetsåtgärder

Användning av qPCR-tester kräver god laboratoriesed, inklusive underhåll av utrustning, som är speciellt anpassad till molekylärbiologi och som uppfyller tillämpliga regler och relevanta standarder. Komponenterna i den här produkten räcker för att utföra 24 reaktioner i varje analys.

- Kassera avfall från prover och analyser i enlighet med lokala säkerhetsprocedurer.
- Reagenserna som ingår i *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit har spänts ut optimalt. Späd inte ut reagenserna ytterligare då det kan resultera i förlorad prestanda.

- Alla reagenser som medföljer *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser som ingår i samma kit. Byt inte ut reagenser mellan *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kits, eftersom det kan påverka prestandan.
- Ytterligare instruktioner om varningar och säkerhetsåtgärder samt fler procedurbeskrivningar finns i användarhandböckerna till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet, Rotor-Gene AssayManager v2.1 och Gamma-plugin-programmet.
- Ändring av inkuberingstider och/eller temperaturer kan orsaka felaktiga eller icke överensstämmande data.
- Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.
- Iaktta största försiktighet vid användning av positiva kontroller för att undvika korskontaminering.
- Iaktta största försiktighet för att undvika överföring av smitta via carry-over av cDNA- eller PCR-produkter, vilket kan orsaka en falskt positiv signal.
- Iaktta största försiktighet för att förhindra kontaminering av RNase eller DNase, eftersom det kan orsaka försämring av RNA- eller cDNA-mallar.
- Öppna inte instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM förrän körningen har avslutats.
- Iaktta största noggrannhet med betoning på felaktig provinmatning, laddningsfel och pipetteringsfel för att säkerställa korrekt provtestning.
- Se till att proverna hanteras på ett systematiskt sätt för att säkerställa att identifieringen alltid blir korrekt så att proverna går att spåra.

Vi rekommenderar följande hantering:

- Använd nukleasfritt laboratoriematerial (t.ex. pipetter, pipettspetsar, reaktionsflaskor)
- Använd nya aerosolresistanta pipettspetsar för alla pipetteringssteg för att undvika korskontaminering av prover och reagenser.



- Bered för-PCR-huvudmix med därför avsedda tillbehör (pipetter, spetsar etc.) i ett anpassat utrymme där inget DNA-material (cDNA, plasmid eller PCR-produkter) förs in.
- Tillsätt mall i ett separat utrymme (helst i ett annat rum) med hjälp av specialanpassat material (pipetter, spetsar etc.).

Information om de reagenser och kit som används för provberedning finns i motsvarande handbok. Säkerhetsinformation för RNeasy Midi Kit (kat.nr 75144) och EL Buffer (kat.nr 79217) ingår i *handboken till RNeasy Midi/Maxi (RNeasy Midi/Maxi Handbook)* och säkerhetsinformation för RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat.nr 74204) ingår i *handboken till RNeasy MinElute Cleanup (RNeasy MinElute Cleanup Handbook)*.

## Förvaring och hantering av reagens

### Leveransvillkor

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit levereras på kolsyreis. Om någon komponent i *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit inte är frusen vid ankomst, om den yttre förpackningen har öppnats under transporten eller om det saknas en bipacksedel eller reagenser i leveransen ska du kontakta någon av QIAGENs tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

### Förvaring

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ska vid mottagandet omedelbart förvaras i -30 °C till -15 °C i en frys med konstant temperatur. qPCR-mix måste skyddas mot ljus.

För information om förvaring av de reagenser och kit som används för provberedning: RNeasy Midi Kit (kat.nr 75144), Buffer EL (kat.nr 79217), RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat.nr 74204), se motsvarande handbok.

## Stabilitet

Vid förvaring under de angivna förvaringsvillkoren är *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit stabilt fram tills det utgångsdatum som anges på etiketten.

När reagenser har öppnats kan de förvaras i originalförpackningen vid -30 °C till -15 °C fram till angivet utgångsdatum. Överskrid inte maximalt fem frys-/upptiningscykler.

För information om stabilitet för de reagenser och kit som används för provberedning: RNeasy Midi Kit (kat.nr 75144), Buffer EL (kat.nr 79217), RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat.nr 74204), se motsvarande handbok.

## Förvaring och hantering av prover

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit är avsett att användas med RNA-prover som extraherats från helblod. Alla prover ska betraktas som potentiellt smittfarliga.

### Helblodsprover

- Helblodsprover ska antikoaguleras med kalium-EDTA (K<sub>2</sub>-EDTA) och förvaras vid 2–8 °C i högst 4 dagar före RNA-extraktion.
- Använd inte fryst blod.
- Märk, hantera och förvara blodprover på ett kontrollerat sätt enligt lokala procedurer.

**Obs:** Helblodsprover måste levereras under samma förhållanden som vid förvaring för att undvika temperaturförändringar.

---

## RNA-prover

- Renat RNA kan förvaras i -30 °C till -15 °C efter isolering, eller vid lägre temperaturer (-90 °C till -65 °C) om långtidsförvaring krävs.
- Märk, hantera och förvara RNA-prover på ett kontrollerat sätt enligt lokala procedurer.

**Obs:** RNA-prover måste levereras under samma förhållanden som vid förvaring för att undvika temperaturförändringar under förvaring och leverans.

# Procedur

Den totala mängden RNA ska renas från 10 ml perifert helblod som samlats in i EDTA-rör.

- Säkerställ att reagenser som ska användas för erythrocytlysering, RNA-isolering och RNA-koncentration inte har passerat utgångsdatum och att de har transporterats och förvarats under rätt förhållanden.
- Använd RNeasy Midi Kit (kat.nr 75144) och Buffer EL för erythrocytlysering (kat.nr 79217) vid RNA-rening från perifert helblod.

## Erythrocytlyseringsprotokoll för isolering av totalt antal leukocyter från helblod

Det här protokollet är utformat för att isolera totalt antal leukocyter från 10 ml humant helblod med Buffer EL (kat.nr 79217).

**Obs:** Protokollet är inte avsett att användas med frysta helblodsprover.

### Viktigt att tänka på före start

- Blod och kroppsvätska från människor ska alltid betraktas som potentiellt smittfarligt. Vid hantering av helblod måste alla nödvändiga åtgärder som rekommenderas av de nationella tillsynsmyndigheterna vidtas.
- RLT-buffert (Buffer RLT) kan bilda en fällning vid förvaring. Lös upp den genom uppvärmning vid behov och låt sedan stå i rumstemperatur.
- Erythrocytlyseringen ska utföras på is.
- Centrifugeringssteg 3 och 5 i protokollet ska utföras vid 4 °C i en standardlaboratoriecentrifug.

## Saker som ska göras före start

- Bered RLT-buffert (medföljer RNeasy Midi Kit) genom att tillsätta  $\beta$ -merkaptoetanol ( $\beta$ -ME): Tillsätt 10  $\mu$ l  $\beta$ -ME per 1 ml RLT-buffert.
- RLT-buffert är stabil i 1 månad efter att  $\beta$ -ME har tillsatts.  
**Obs:**  $\beta$ -ME är giftigt; dosera i ett dragskåp och bär lämplig skyddsutrustning.  
**Obs:** RLT-buffert innehåller guanidinisotiocyanat, som kan bilda starkt reaktiva föreningar när det kombineras med blekmedel. Tillsätt inte blekmedel eller sura lösningar direkt i avfallet från provberedningen.

## Procedur

1. Tillsätt 40 ml EL-buffert i 10 ml helblod i ett enda 50 ml centrifugrör. Blanda genom att vända röret några gånger.
2. Inkubera i 15 minuter på is. Blanda genom att vända röret några gånger vid två tillfällen under inkuberingen.  
**Obs:** Den grumliga suspensionen blir genomskinlig under inkuberingen, vilket indikerar lysering av röda blodkroppar.
3. Centrifugera i 400 x g under 10 minuter vid 4 °C. Kassera all supernatant. Spara leukocytpelleten.  
**Obs:** Leukocyterna bildar en pellet efter centrifugeringen. Säkerställ att supernatanten avlägsnas helt. Spår av röda blodkroppar som kan finnas kvar elimineras under de steg som följer.  
En ofullständig borttagning av supernatanten hämmar lyseringen och späder ut lysatet, vilket påverkar förutsättningarna för hur RNA binder till RNeasy-membranet. Båda effekterna kan minska RNA-utfallet.
4. Tillsätt 20 ml EL-buffert i leukocytpelleten och resuspendera genom att pipettera upp och ned.

5. Centrifugera i 400 x g under 10 minuter vid 4 °C. Kassera all supernatant. Spara leukocypelleten.

**Obs:** De centrifugeringssteg som följer (t.ex. RNA-isolering) måste utföras i 20–25 °C.

6. Lossa leukocypelleten genom att snäppa till med fingret mot röret och överföra pelleten till 4 ml RLT-buffert med tillsatt  $\beta$ -ME. Blanda genom att vortexa eller pipettera.

**Obs:** Se till att  $\beta$ -ME tillsätts i RLT-bufferten före användning.

7. Säkerställ upplösning med hjälp av en konventionell rotor-stator-homogenisator. Kör minst 45 sekunder på full hastighet tills provet är homogent. Ett alternativ är att vortexa provet i 10 sekunder och låta lysatet passera minst 10 gånger genom en nål med diametern 18–20 gauge som sitter i en RNase-fri spruta.

**Obs:** En ofullständig upplösning leder till signifikant lägre utfall på grund av att RNeasy-kolonnen täpps till. Upplösning med rotor-stator-homogenisator resulterar i allmänhet i högre utfall av den totala mängden RNA jämfört med andra homogeniseringsmetoder.

**Obs:** Prover kan förvaras i –90 °C till –65 °C i lyseringsbuffert efter upplösning. Frysta prover är stabila i flera månader.

## Isolering av total mängd RNA

Det här protokollet är utformat för isolering av den totala mängden cellulärt RNA från homogeniserat leukocytlysat som har resuspenderats i 4 ml RLT/ $\beta$ -ME.

### Viktigt att tänka på före start

- Nedbrytning av DNase krävs inte eftersom RNeasy-silikonmembrantekniken effektivt avlägsnar nästan allt DNA.
- RLT-buffert och RW1-buffert (Buffer RW1) innehåller ett guanidinsalt och är därför inte kompatibelt med desinficeringsreagenser som innehåller blekmedel. Guanidin är klassat som irriterande. Vidta lämpliga säkerhetsåtgärder och använd handskar vid hantering.
- RNeasy-protokollet ska utföras i rumstemperatur. Arbeta snabbt under proceduren.

- Alla centrifugeringssteg ska utföras i 20–25 °C. Kontrollera att centrifugen inte blir kallare än 20 °C.
- Vid varje centrifugeringssteg måste hela volymen passera genom kolumnen. Det kan bli nödvändigt att upprepa centrifugeringen.

## Saker som ska göras före start

- Tina om nödvändigt lysatet i rumstemperatur innan RNA-isoleringsprotokollet påbörjas.
- Bered 4 ml 70-procentig etanol per prov.
- RPE-buffert (RPE Buffer) levereras som ett koncentrat. Tillsätt 4 volymer etanol (96–100 %) innan det används för första gången enligt anvisningarna på flaskan. På så sätt erhålls en arbetslösning.

## Procedur

1. Tillsätt 4 ml 70-procentig etanol i lysatet och blanda noggrant genom att skaka kraftigt. Centrifugera inte.

**Obs:** En synlig fällning kan bildas efter tillsats av etanol. Lös upp fällningen helt genom att skaka kraftigt och gå sedan omedelbart vidare till steg 2. En otillräcklig upplösning av fällning kan orsaka DNA-kontaminering vilket kan leda till ett orent totalt RNA-prov.

2. Applicera provet, inklusive eventuell fällning, i en RNeasy Midi-kolonn som placerats i ett 15 ml centrifugrör (medföljer). Förslut röret varsamt och centrifugera i 5 minuter i 4 000 × g. Kassera den genomströmmade vätskan.

**Obs:** Högsta tillåtna laddningsvolym är 4 ml. Om volymen överstiger 4,0 ml ska du ladda portioner successivt i RNeasy-kolonnen och centrifugera enligt ovan. Kassera den genomströmmade vätskan efter varje centrifugeringssteg.

Återanvänd centrifugröret i steg 3.

3. Tillsätt 4 ml RW1-buffert i RNeasy-kolumnen. Förslut centrifugröret varsamt och tvätta kolumnen genom att centrifugera i 5 minuter i  $4\ 000 \times g$ . Kassera den genomströmmade vätskan.

**Obs:** Den genomströmmade vätskan innehåller RLT-buffert eller RW1-buffert och är därför inte kompatibel med blekmedel.

Återanvänd centrifugröret i steg 4.

4. Tillsätt 2,5 ml RPE-buffert i RNeasy-kolumnen. Förslut centrifugröret varsamt och tvätta kolumnen genom att centrifugera i 2 minuter i  $4\ 000 \times g$ .

**Obs:** RPE-bufferten levereras som ett koncentrat. Se till att etanol tillsätts i RPE-bufferten före användning.

Återanvänd centrifugröret i steg 5. Den genomströmmade vätskan behöver inte kasseras.

5. Tillsätt ytterligare 2,5 ml RPE-buffert i RNeasy-kolumnen. Förslut centrifugröret varsamt och torka RNeasy-silikongelmembranet genom att centrifugera i 5 minuter i  $4\ 000 \times g$ .

**Obs:** Det är viktigt att du torkar av RNeasy-membranet eftersom rester av etanol kan interferera med nedströms-reaktionerna. Centrifugeringen säkerställer att ingen etanol överförs under elueringen.

**Obs:** Efter slutförd centrifugering tar du försiktigt bort RNeasy-kolumnen från centrifugröret. Kolumnen får inte komma i kontakt med den genomströmmade vätskan eftersom det leder till att etanol överförs.

6. Eluera genom att flytta RNeasy-kolumnen till ett nytt 15 ml uppsamlingsrör (medföljer). Pipettera 200  $\mu$ l RNase-fritt vatten direkt på RNeasy-silikongelmembranet. Förslut röret varsamt. Låt det stå i 1 minut och centrifugera därefter i 3 minuter i  $4\ 000 \times g$ .
7. Upprepa elueringssteget (steg 6) med eluatet från steg 6 och centrifugera därefter i 5 minuter i  $4\ 000 \times g$ .

**Obs:** RNA kan förvaras i  $-90\ ^\circ\text{C}$  till  $-65\ ^\circ\text{C}$  om förvaring under lång tid krävs.



## Kvalificering och kvantifiering av RNA

Analyskvaliteten beror i hög grad på kvaliteten hos input-RNA:t. Vi rekommenderar att renat RNA analyseras med hjälp av agarosgelelektrofores eller spektrofotometri innan analys.

- En blank med nukleasfritt vatten (PCR-grade) ska användas för att kalibrera spektrofotometern.
- OD på 1,0 vid 260 nm motsvarar ungefär 40 µg/ml enkelsträngat RNA.
- En  $OD_{260}/OD_{280}$ -kvot på mellan 1,8 och 2,1 indikerar RNA med hög reningsgrad.

För att utföra RT-steget krävs en RNA-koncentration på 200 ng/µl. Om RNA-koncentrationen i eluatet är mindre än 200 ng/µl ska RNA-koncentrationen i eluatet ökas med hjälp av RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN, kat.nr 74204).

Om RNA-koncentrationen i eluatet är högre än det övre gränsvärdet ska koncentrationen justeras till 200 ng/µl med RNase-fritt vatten.

**Obs:** Kontrollera RNA-koncentrationen efter normaliseringen.

### RNA-koncentration

Det här protokollet är optimerat för koncentration av RNA.

### Viktigt att tänka på före start

- Nedbrytning av DNase krävs inte eftersom RNeasy MinElute-silikonmembrantekniken effektivt avlägsnar nästan allt DNA.
- RLT-buffert innehåller ett guanidinsalt och är därför inte kompatibelt med desinficeringsreagenser som innehåller blekmedel.
- Utför alla steg i proceduren i rumstemperatur (15–25 °C). Arbeta snabbt under proceduren.

- Utför alla centrifugeringssteg i 20–25 °C i en standardmikrocentrifug. Kontrollera att centrifugen inte blir kallare än 20 °C.
- RLT-buffert kan bilda en fällning vid förvaring. Lös upp vid behov genom uppvärmning och låt sedan stå i rumstemperatur (15–25 °C).

## Saker som ska göras före start

- Bered 500 µl 80% etanol för varje RNA-prov som ska koncentreras.
- RPE-bufferten levereras som ett koncentrat. Tillsätt 4 volymer etanol (96–100 %) innan det används för första gången enligt anvisningarna på flaskan. På så sätt erhålls en arbetslösning.
- Förbered kolonnerna i rumstemperatur innan du börjar.
- Mät volymen på proverna som ska behandlas och justera så att den slutliga provvolymen är 200 µl.

## Procedur

1. När du har justerat provet till en volym på 200 µl med RNase-fritt vatten tillsätter du 700 µl RLT-buffert och blandar noga.
2. Tillsätt 500 µl etanol (96–100 %) i RNA-spädningen och blanda noga genom att pipettera. Centrifugera inte. Gå sedan omedelbart vidare till steg 3.
3. Överför maximalt 700 µl av provet till en RNeasy MinElute-spinnkolonn som är placerad i ett 2 ml uppsamlingsrör (medföljer). Stäng locket försiktigt och centrifugera i 15 sekunder i  $\geq 8\,000 \times g$  ( $\geq 10\,000$  rpm). Kassera den genomströmmade vätskan. Överför eventuellt återstående prov (upp till 700 µl) och upprepa centrifugeringen. Kassera den genomströmmade vätskan.  
**Obs:** Den genomströmmade vätskan innehåller RLT-buffert och är därför inte kompatibel med blekmedel. Säkerhetsinformation finns i "Varningar och försiktighet", sida 15.
4. Placera RNeasy MinElute-spinnkolonnen i ett nytt 2 ml uppsamlingsrör (medföljer).

5. Tillsätt 500 µl RPE-buffert i spinnkolonnen. Stäng locket försiktigt och centrifugera i 15 sekunder i  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10\,000$  rpm) för att tvätta membranet på spinnkolonnen. Kassera den genomströmmade vätskan.

**Obs:** RPE-bufferten levereras som ett koncentrat. Se till att etanol tillsätts i RPE-bufferten före användning.

Återanvänd uppsamlingsröret i steg 6.

6. Tillsätt 500 µl 80 % etanol i RNeasy MinElute-spinnkolonnen. Stäng locket försiktigt och centrifugera i 2 minuter i  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10\,000$  rpm) för att tvätta membranet på spinnkolonnen. Kassera den genomströmmade vätskan och uppsamlingsröret.

**Obs:** Den genomströmmade vätskan innehåller RLT-buffert och är därför inte kompatibel med blekmedel.

**Obs:** Ta försiktigt bort RNeasy MinElute-spinnkolonnen från uppsamlingsröret efter centrifugeringen så att kolonnen inte kommer i kontakt med den genomströmmade vätskan. Om detta sker kommer etanol att överföras.

7. Placera RNeasy MinElute-spinnkolonnen i ett nytt 2 ml uppsamlingsrör (medföljer).
8. Öppna locket till spinnkolonnen och centrifugera i full hastighet i 5 minuter. Kassera den genomströmmade vätskan och uppsamlingsröret.

För att undvika att locken på spinnkolonnerna skadas placerar du spinnkolonnerna i centrifugen med minst en tom position mellan kolonnerna. Rikta locken så att de pekar i motsatt riktning mot rotorns rotation (om t.ex. rotorn roterar medurs riktar du locken moturs).

Det är viktigt att du torkar av membranet på spinnkolonnen eftersom rester av etanol kan interferera med nedströms-reaktionerna. Centrifugering av spinnkolonnerna med öppna lock säkerställer att ingen etanol överförs under RNA-eluering.

9. Placera RNeasy MinElute-spinnkolonnen i ett nytt 1,5 ml uppsamlingsrör (medföljer).
10. Tillsätt 20 µl RNase-fritt vatten direkt i mitten av spinnkolonnens membran. Stäng locket försiktigt och centrifugera i full hastighet i 1 minut för att eluera RNA:t.
11. När elueringen är slutförd placerar du proverna på is.

12. Mät volymen på proverna som ska behandlas och justera så att den slutliga koncentrationen blir 200 ng/μl.

Mer information finns i "Kvalificering och kvantifiering av RNA", sida 25.

## Omvänd transkription

### Saker som ska göras före start

- Tina alla komponenter som behövs förutom det omvända transkriptaset, som måste förvaras i fryn när det inte används. Placera rören som innehåller komponenterna som ska tinas på is.  
**Obs:** Låt inte upptiningstiden överstiga 30 minuter eftersom materialet då kan försämrats.
- Rengör bänkytan som ska användas för den omvända transkriptionen (RT) för att säkerställa att mall- eller nukleaskontaminering undviks.
- Blanda noga genom att pipettera rören med reagenser för omvänd transkription, RNA-prover, positiva kontroller och IS-MMR-kalibrator upp och ned 10 gånger och centrifugera en kort stund innan användning. Förvara därefter på is.
- Den RT-negativa kontrollen genereras under den omvända transkriptionen med hjälp av nukleasfritt vatten (PCR-grade).
- Det behövs 3 μg RNA per prov.
- *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit innehåller tillräckligt mycket reagenser för att utföra tre körningar med åtta prover.

### Procedur

1. Inkubera 15 μl av varje prov, positiva kontroller (hög- och lågpositiva kontroller), vatten (används för att generera den RT-negativa kontrollen) och IS-MMR-kalibrator i 5 minuter i 65 °C. Kyl sedan omedelbart på is i minst 5 minuter.

- Centrifugera en kort stund (ungefär 5 sekunder) för att samla upp vätskan i botten av röret. Förvara därefter på is.
- Bered följande RT-mix enligt det antal prover, kontroller och kalibratorer som ska bearbetas (Tabell 1).

**Obs:** Den slutliga volymen per reaktion måste vara 25 µl.

**Tabell 1. Beredning av RT-mix**

Komponent	Volym per prov (µl)	RT-mix: 12 + 1 reaktioner (µl)	Slutlig koncentration
RT-mix, 3,33x	7,5	97,5	1x
Omvänt transkriptas, 10x	2,5	32,5	1x
Slutlig volym på RT-mix (som ska läggas till i steg 4)	10	130	–
Prov, positiva kontroller, IS-MMR-kalibrator eller vatten (från steg 1)	15	15 i varje	–
<b>Total volym</b>	<b>25</b>	<b>25 i varje</b>	–

- Pipettera 10 µl RT-mix i varje märkt rör innehållande RNA-prov, positiva kontroller, vatten eller kalibrator (från steg 3).
- Blanda noga genom att pipettera upp och ned 10 gånger och centrifugera en kort stund (ungefär 5 sekunder) så att vätskan längst ned i röret samlas upp.

**Obs:** Sätt tillbaka alla reagenser för omvänd transkription i *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit i frysen efter konfigureringen av reaktionerna för att undvika att materialet försämras.

- Placera rören i termocyklern och ställ in programmet för omvänd transkription (Tabell 2).

**Tabell 2. Temperaturprofil för omvänd transkription**

<b>Steg</b>	<b>Parametrar</b>
Reverse transcription 1 (Omvänd transkription 1)	Temperature (Temperatur): 25°C Time (Tid): 10 minuter
Reverse transcription 2 (Omvänd transkription 2)	Temperature (Temperatur): 46°C Time (Tid): 45 minuter
Inactivation (Inaktivering)	Temperature (Temperatur): 85°C Time (Tid): 5 minuter
Cooling (Nedkyllning)	Temperatur: 4°C Time (Tid): 5 minuter

7. När programmet har slutförts ska rören centrifugeras en kort stund (ungefär 5 sekunder) så att vätskan längst ned i röret samlas upp. Förvara rören på is eller i -20 °C tills qPCR-analysen ska utföras.

## Manuell analys: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med rotor med 72-rör och RGQ-programvara

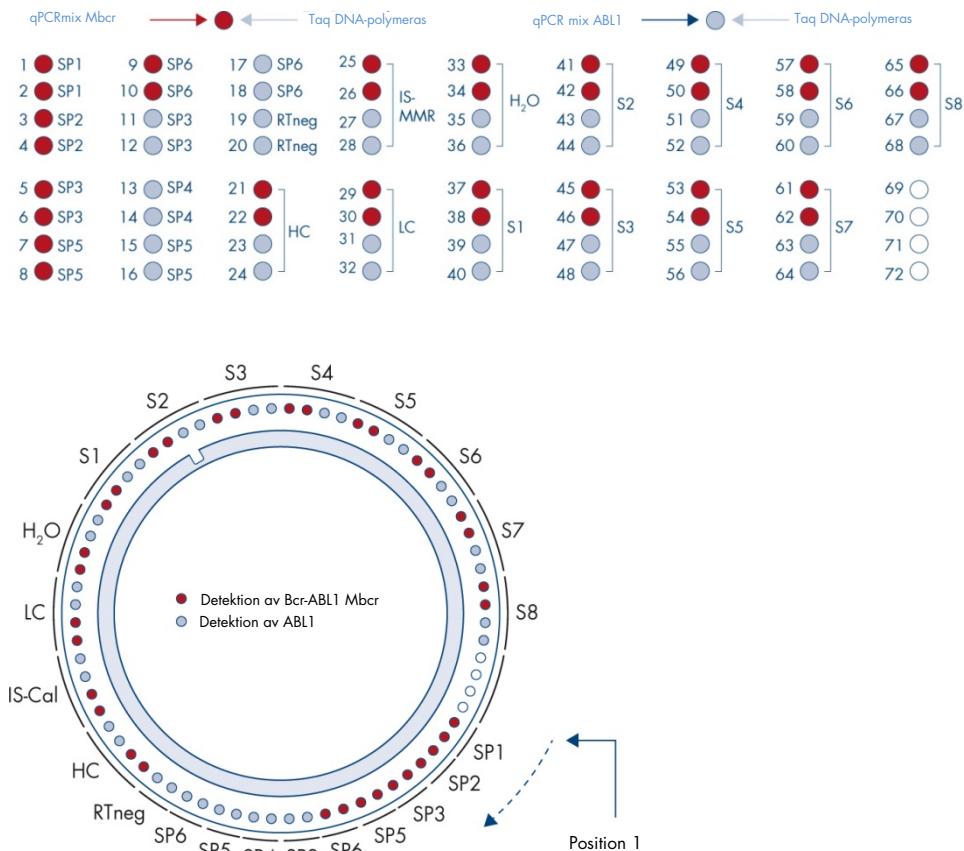
Vi rekommenderar att alla mätningar utförs i duplikat enligt Tabell 3. Kitet möjliggör testning av åtta cDNA-prover i samma analys i duplikat. Tre analyser kan utföras med *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit.

**Tabell 3. Antal reaktioner för Rotor-Gene Q-instrument med rotor med 72 rör**

Prov	Reaktioner
<b>Med qPCR Mix ABL1 (34 reaktioner)</b>	
8 cDNA-prover	8 × 2 reaktioner
1 cDNA högpositiv kontroll	2 reaktioner
1 cDNA lågpositiv kontroll	2 reaktioner
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reaktioner
Enkelplasmidstandarder	4 × 2 reaktioner (SP3, SP4, SP5 och SP6)
RT-negativ kontroll	2 reaktioner
Vattenkontroll	2 reaktioner
<b>Med qPCR Mix MbcR (34 reaktioner)</b>	
8 cDNA-prover	8 × 2 reaktioner
1 cDNA högpositiv kontroll	2 reaktioner
1 cDNA lågpositiv kontroll	2 reaktioner
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reaktioner
Enkelplasmidstandarder	5 × 2 reaktioner (SP1, SP2, SP3, SP5 och SP6)
Vattenkontroll	2 reaktioner

## Konfiguration för laddningsblock och rotor

Vi rekommenderar testning av minst åtta cDNA-prover i samma analys för att optimera användningen av standarder, primers och probmixar. Rotorschemat i Figur 3 visar en exempelanlys.



**Figur 3. Rotorkonfiguration för varje analys. SP1–SP6:** BCR-ABL1 Mbcr- och ABL1-standarder; **RTneg:** RT-negativ kontroll; **IS-Cal:** IS-MMR-kalibrator; **HC:** Högpositiv kontroll; **LC:** Lågpositiv kontroll; **H<sub>2</sub>O:** vattenkontroll; **S1–S8:** cDNA-prover.



**Obs:** Fyll alla tomma positioner med tomma rör. Siffrorna markerar positioner i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.

## Konfigurera qPCR

### Saker som ska göras före start

- Tina alla komponenter som behövs förutom *Taq* DNA-polymeraset, som måste förvaras i fryn när det inte används. Placera rören som innehåller komponenterna som ska tinas på is.

**Obs:** Låt inte upptiningstiden överstiga 30 minuter eftersom materialet då kan försämrats.

- Rengör bänkytan som ska användas för beredning av PCR-mix för att säkerställa att mall- eller nukleaskontaminering undviks
- Blanda noga genom att pipettera rören med qPCR Mix ABL1 och qPCR Mix Mbcr upp och ned 10 gånger och centrifugera en kort stund innan användning. Förvara därefter på is.

### Procedur

1. Bered PCR-huvudmixen enligt det antal prover som ska bearbetas.

I Tabell 4 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensmix, beräknat för att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 25 µl. En förmix bereds enligt det aktuella antalet reaktioner, med samma primers och probmix (antingen qPCR Mix ABL1 eller qPCR Mix Mbcr). Extra volymer ingår för att kompensera för pipetteringsfel.

**Obs:** Använd inte reaktionsvolymen (reaktionsmix plus prov) på mindre än 25 µl.

**Tabell 4. Beredning av PCR-huvudmix**

Komponent	1 reaktion (µl)	Förmix ABL1 eller Mbcr: 34 + +2 reaktioner (µl)	Slutlig koncentration
qPCR-mix (antingen qPCR Mix ABL1 eller qPCR Mix Mbcr)	19,75	711	1x
<i>Taq</i> DNA-polymeras	0,25	9	1x
Prov, standard, kontroll eller IS-MMR-kalibrator (som ska läggas till i steg 3)	5	5 i varje	–
<b>Total volym</b>	<b>25</b>	<b>25 i varje</b>	–

- Fördela 20 µl qPCR-förmix i varje 0,1 ml Rotor-Gene Q-rör.
- Tillsätt 5 µl RT-produkt (cDNA) som erhållits efter den omvända transkriptionen (se "Omvänd transkription", sida 28), 5 µl av standarder, 5 µl av kontroller eller IS-MMR-kalibrator enligt provlayouten som visas i Figur 4 (total volym 25 µl).
- Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.

## Förbereda Rotor-Gene MDx och starta qPCR-körningen

- Placera rören i adaptern som medföljer instrumentet.  
**Obs:** Oanvända positioner måste fyllas med tomma rör.
- Placera låsringen över rören och tryck på den för att låsa.
- Ladda den fulla adaptern i instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- Programmera instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM med termocyklingsprogrammet enligt Tabell 5.

**Obs:** Sätt tillbaka alla *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit-komponenter i frysen för att undvika att materialet försämras.

**Tabell 5. Temperaturprofil för qPCR**

Steg	Parametrar
Mode of analysis (Analysläge)	Quantitation (Kvantifiering)
Hold 1 (Uppehåll 1)	Temperature (Temperatur): 95°C Time (Tid): 15 minuter
Cycling (Cykling)	50 cykler 94 °C; 15 sekunder 60 °C; 60 sekunder med hämtning av FAM-fluorescens i den gröna kanalen.

5. Klicka på "Gain Optimisation" (Optimering av förstärkning) i dialogrutan "New Run Wizard" (Guide för ny körning) för att öppna dialogrutan "Auto-Gain Optimisation Setup" (Ställ in automatisk optimering av förstärkning). Kontrollera att intervallet för den gröna kanalen ligger mellan "5 Fl" för "Min Reading" (Min. avläsning) och "10 Fl" för "Max Reading" (Max. avläsning) och att värdet för Gain ligger inom det acceptabla intervallet från -10 till 10.
6. Kontrollera att alternativet "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Utför optimering före första hämtning) är markerat och stäng dialogrutan "Auto-Gain Optimisation Setup" (Inställningar av automatisk optimeringsvinst).
7. Starta termocyklingsprogrammet.
8. Skapa delmängder för både ABL1 och MbcR genom att ange information i fönstret "Edit Samples" (Redigera prover).
9. Välj "Options" (Alternativ) och "Crop Start Cycles" (Ta bort startcykler) när termocyklingen har slutförts. Ta bort data innan cykel 10. Välj sedan "Analysis" (Analys) och "Cycling A. Green from 10" (Cykling A. grön från 10), vilket indikeras i rapporten som "left threshold = 10.00" (vänster tröskelvärde = 10,00).

---

10. Fortsätt enligt följande för både ABL1 och MbcR:

- Om fönstret "Calculate Automatic Threshold" (Beräkna automatiskt tröskelvärde) öppnas väljer du "Cancel" (Avbryt).
- Definiera tröskelvärdet vid 0,03 (nere till höger i fönstret).
- Välj "Dynamic Tube" (Dynamiskt rör) som normaliseringsmetod i rapporten och "Slope correct" (Lutning korrekt) för att korrigera lutningen på bruset.
- Kontrollera att "Outlier Removal" (Ta bort extremvärde) är inställt på 0 % (motsvarande NTC-tröskelvärdet) och att "Reaction Efficiency Threshold" (Tröskelvärde för reaktionseffektivitet) är inaktiverat.
- Ställ in diagrammet på linjär skala och "Auto-Scale" (Autoskala).
- Högerklicka i fönstret där amplifieringskurvorna visas och kontrollera att "Digital filter" (Digitalt filter) är inställt på "Light" (Ljust).
- Markera alternativet "named on" (namngiven) (till höger om fönstret) för att säkerställa att alla prover visas.

När alla stegen är slutförda kontrollerar du att rådata registreras och fortsätter till resultatanalysen (se "Princip för dataanalys", sida 48).

## Automatiserad analys: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med rotor med 72 rör och RGAM-programvara

Vi rekommenderar att alla mätningar utförs i duplikat enligt Tabell 6. Kitet möjliggör testning av åtta cDNA-prover i samma analys i duplikat. Tre analyser kan utföras med kitet *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR.

Tabell 6. Antal reaktioner för Rotor-Gene Q-instrument med rotor med 72 rör

Prov	Reaktioner
<b>Med qPCR Mix ABL1 (34 reaktioner)</b>	
8 cDNA-prover	8 × 2 reaktioner
1 cDNA högpositiv kontroll	2 reaktioner
1 cDNA lågpositiv kontroll	2 reaktioner
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reaktioner
Enkelplasmidstandarder	4 × 2 reaktioner (SP3, SP4, SP5 och SP6)
RT-negativ kontroll	2 reaktioner
Vattenkontroll	2 reaktioner
<b>Med qPCR Mix MbcR (34 reaktioner)</b>	
8 cDNA-prover	8 × 2 reaktioner
1 cDNA högpositiv kontroll	2 reaktioner
1 cDNA lågpositiv kontroll	2 reaktioner
1 cDNA IS-MMR-kalibrator	2 reaktioner
Enkelplasmidstandarder	5 × 2 reaktioner (SP1, SP2, SP3, SP5 och SP6)
Vattenkontroll	2 reaktioner

### Viktigt att tänka på före start

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit måste köras på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM med Rotor-Gene AssayManager v2.1. Ta dig tid att bekanta dig med instrumentet

Rotor-Gene Q MDx innan du startar protokollet. Detaljerad information finns i användarhandböckerna för instrumentet, Rotor-Gene AssayManager v2.1 och Gamma-plugin-programmet.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 möjliggör automatisk tolkning av PCR-resultaten. Cykelparametrarna är låsta för körningen.

### Saker som ska göras före start

Programmet Rotor-Gene AssayManager v2.1 måste installeras på datorn som är ansluten till Rotor-Gene Q. Du kan ladda ned programmet från QIAGENs webbplats: **[http://www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager\\_v2.1.aspx](http://www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2.1.aspx)**. Detaljerad information om installation av Rotor-Gene AssayManager v2.1 finns i användarhandbok för Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application.

- *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit kräver ett specifikt Gamma-plugin-program. Detta plugin-program kan hämtas från QIAGENs webbplats på: **<https://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=bfb8c9a8-245b-4ab4-99ea-1b39e2c243a0&lang=en>**. Detta plugin-program måste installeras på en dator som redan har Rotor-Gene AssayManager v2.1 installerat.
- *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit behöver även en analysprofil. Den här analysprofilen (\*.iap-fil) innehåller alla parametrar som behövs för cykling och analysering av qPCR-analysen. Den kan laddas ned från den särskilda webbsidan för *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit på QIAGENs webbplats **<https://www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-bcr-abl1-mbcR-rgq-rt-pcr-kit-ce/#resources>** Analysprofilen måste importeras till Rotor-Gene AssayManager v2.1-programmet.

Obs: *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit kan bara köras om vissa konfigurationsinställningar har gjorts i programmet Rotor-Gene AssayManager v2.1.

---

För en systemomfattande processsäkerhet måste följande obligatoriska konfigurationsinställningar göras för det stängda läget:

- "Material number required" (Materialnummer krävs)
- "Valid expiry date required" (Giltigt utgångsdatum krävs)
- "Lot number required" (Lotnummer krävs)

## Installation av Gamma-plugin-programmet och import av analysprofilen

Installation och import av Gamma-plugin-programmet och analysprofilen beskrivs i handböckerna till Rotor-Gene AssayManager v2.1 och Gamma-plugin-programmet, Användarhandbok till Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application och Användarhandbok till Gamma-plugin-programmet.

- Ladda ned både Gamma-plugin-programmet och den senaste versionen av ipsogen\_BCR-ABL1Mbc(ABL)\_blood\_CE-analysprofilen från QIAGENs webbplats.
- Starta installationsprocessen genom att dubbelklicka på filen RGAM\_V2\_1\_Gamma\_Plug-in.Installation.V1\_0\_0.msi och sedan följa instruktionerna för installation. En detaljerad beskrivning av den här processen finns i avsnittet om installation av plugin-program i Användarhandbok till Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application.

Obs: För en systemomfattande processsäkerhet väljer du fliken "Settings" [Inställningar] och markerar kryssrutorna för "Material number required" [Materialnummer krävs], "Valid expiry date required" [Giltigt utgångsdatum krävs] och "Lot number required" [Lotnummer krävs] för det stängda läget (avsnittet Arbetslista). Markera kryssrutorna om de inte redan är markerade.

- 
- När plugin-programmet har installerats måste en person med administratörsrättigheter för programmet Rotor-Gene AssayManager importera analysprofilen ipsogen\_BCR-ABL1Mbc(ABL)\_blood\_CE på följande sätt.

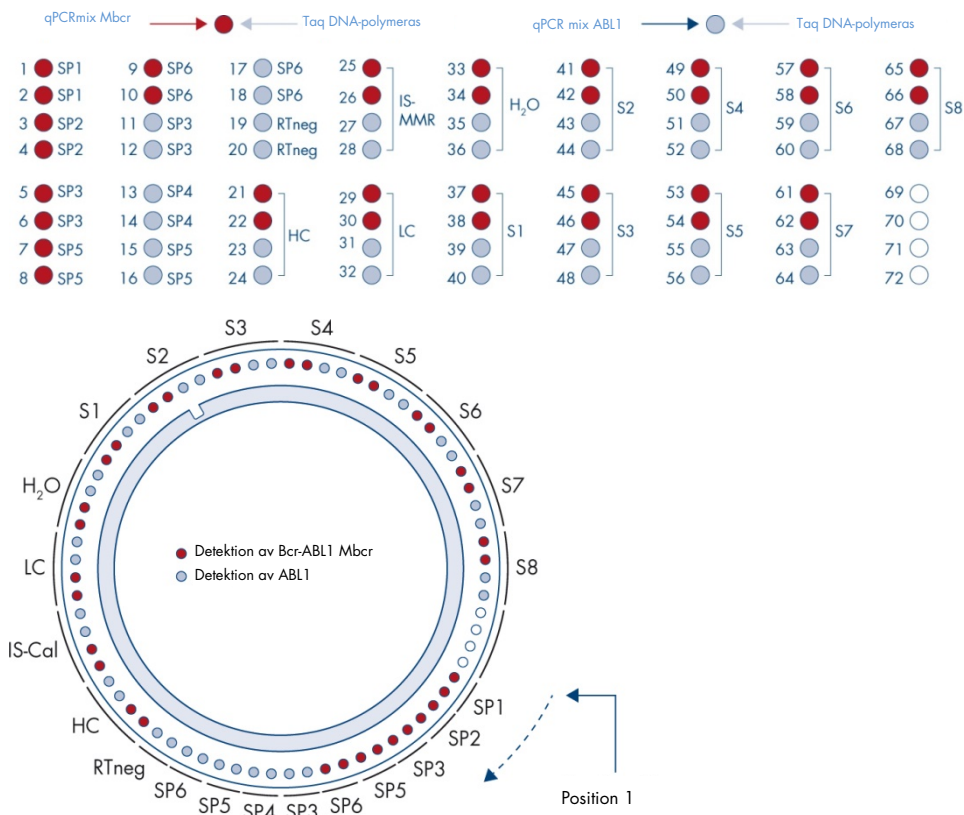
1. Logga in i programmet Rotor-Gene AssayManager v2.1 som administratör.
2. Välj konfigurationsmiljön.
3. Välj fliken "Assay Profiles" (analysprofiler).
4. Klicka på knappen "Import" (importera).
5. I dialogrutan väljer du analysprofilen ipsogen\_BCR-ABL1Mbc(ABL)\_blood\_CE som ska importeras och klickar på "Open" (Öppna).
6. När analysprofilen har importerats kan den användas i miljön "Setup" [Installation].

**Obs:** Samma version av en analysprofil kan inte importeras två gånger.



## Konfiguration för laddningsblock och rotor

Vi rekommenderar testning av minst åtta cDNA-prover i samma analys för att optimera användningen av standarder, primers och probmixar. Rotorschemat i Figur 4 visar en exempelanalys.



**Figur 4. Rotorkonfiguration för varje analys. SP1–SP6:** BCR-ABL1 MbcR- och ABL1-standarder; RTneg: RT-negativ kontroll; IS-Cal: IS-MMR-kalibrator; HC: Högpositiv kontroll; LC: Lågpositiv kontroll; H<sub>2</sub>O: vattenkontroll; S1–S8: cDNA-prover. **Obs:** Fyll alla tomma positioner med tomma rör. Siffrorna markerar positioner i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.



Rören måste sättas in i rotorn enligt Figur 4, eftersom inställningen för automatisk analys i analysprofilen är baserad på denna organisation. Om du använder en annan layout blir resultaten avvikande.

Obs: Fyll alla lediga positioner med tomma rör.

## Skapa en arbetslista

Skapa en arbetslista för de prover som ska bearbetas på följande sätt.

1. Slå på instrumentet Rotor-Gene Q MDx.
2. Öppna programmet Rotor-Gene AssayManager v2.1 och logga in som användare med operatörsbehörighet i stängt läge.
3. Klicka på knappen "New manual work list" (ny manuell arbetslista) i work list manager ("Setup"-miljön).
4. Välj analysprofilen "ipsogen\_BCR-ABL1Mbc(ABL)\_blood\_CE" i listan med tillgängliga analysprofiler i steget "Assay" (Analys).
5. Klicka på knappen "Add assay to work list" (Lägg till analys i arbetslista) för att överföra den valda analysprofilen till listan "Selected assay profiles" (Valda analysprofiler).  
Analysprofilen ska nu visas i listan "Selected assay profiles" [Valda analysprofiler].
6. Ange antalet prover i det motsvarande fältet.
7. Välj "Kit information" (Kitinformation) och ange följande information för *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit, vilken finns tryckt på locket till boxen.
  - Materialnummer: 0670923
  - Giltigt utgångsdatum
  - Lotnummer.
8. Välj steget "Samples" (prover). En lista med provinformation visas. Denna lista representerar den förväntade layouten för rotorn.

9. Ange providentifieringsnumren i listan samt eventuell valfri provinformation som en kommentar för varje prov.
10. Välj steget "Properties" (egenskaper) och ange ett namn på arbetslistan.
11. Markera kryssrutan "is applicable" (är tillämplig).
12. Spara arbetslistan.
13. Arbetslistan kan skrivas ut, vilket kan vara till hjälp vid förberedelse och konfiguration av qPCR. Om du vill skriva ut arbetslistan trycker du på knappen "Print work list" (skriv ut arbetslista). Provinformationen inkluderas som en del av denna arbetslista.  
**Obs:** Arbetslistan kan skapas när experimentet har ställts in på instrumentet, eller innan proverna sätts in i instrumentet eftersom filen med arbetslistan kan sparas.

## Konfigurera qPCR

### Saker som ska göras före start

- Tina alla komponenter som behövs förutom *Taq* DNA-polymeraset, som måste förvaras i frys när det inte används. Placera rören som innehåller komponenterna som ska tinas på is.  
**Obs:** Låt inte upptiningstiden överstiga 30 minuter eftersom materialet då kan försämrats.
- Rengör bänkytan som ska användas för beredning av PCR-mix för att säkerställa att mall- eller nukleaskontaminering undviks
- Blanda noga genom att pipettera rören med qPCR Mix ABL1 och qPCR Mix Mbcr upp och ned 10 gånger och centrifugera en kort stund innan användning. Förvara därefter på is.

## Procedur

1. Bered PCR-huvudmixen enligt det antal prover som ska bearbetas.

I Tabell 7 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensmix, beräknat för att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 25 µl. En förmix bereds enligt det aktuella antalet reaktioner, med samma primers och probmix (antingen qPCR Mix ABL1 eller qPCR Mix Mbcr). Extra volymer ingår för att kompensera för pipetteringsfel.

**Obs:** Använd inte reaktionsvolymer (reaktionsmix plus prov) på mindre än 25 µl.

Tabell 7. Beredning av PCR-huvudmix

Komponent	1 reaktion (µl)	Förmix ABL1 eller Mbcr: 34 + +2 reaktioner (µl)	Slutlig koncentration
qPCR-mix (antingen qPCR Mix ABL1 eller qPCR Mix Mbcr)	19,75	711	1×
Taq DNA-polymeras	0,25	9	1×
Prov, standard, kontroll eller IS-MMR-kalibrator (som ska läggas till i steg 3)	5	5 i varje	–
<b>Total volym</b>	<b>25</b>	<b>25 i varje</b>	–

2. Fördela 20 µl qPCR-förmix i varje 0,1 ml Rotor-Gene Q-rör.
3. Tillsätt 5 µl RT-produkt (cDNA) som erhållits efter det omvända transkriptionssteget (se "Omvänd transkription", sida 28), 5 µl av standarder, 5 µl av kontroller eller IS-MMR-kalibrator enligt provlayouten som visas i Figur 4 (total volym 25 µl).
4. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned. ●

## Förbereda Rotor-Gene MDx och starta qPCR-körningen

1. Placera rotorn med 72 brunnar på rotorhållaren i Rotor-Gene Q MDx.
2. Fyll rotorn med rör på remsa enligt deras tilldelade positioner, med början på position 1 enligt Figur 4, och med tomma förslutna rör på remsa i alla oanvända positioner.  
**Obs:** Se till att det första röret sätts in på position 1 och att rören på remsa placeras i rätt riktning och på rätt positioner enligt Figur 4.
3. Sätt dit låsringen.
4. Ladda Rotor-Gene Q MDx-instrumentet med rotorn och låsringen och stäng instrumentluckan.
5. I programmet Rotor-Gene AssayManager v2.1 väljer du antingen den motsvarande arbetslistan i work list manager eller klickar på knappen "Apply" (tillämpa) eller, om arbetslistan fortfarande är öppen, klickar på knappen "Apply" (Tillämpa).  
**Obs:** Om arbetslistan som är dedikerad till experimentet inte har skapats ännu loggar du in i Rotor-Gene AssayManager v2.1 och följer steget "Skapa en arbetslista", sida 42, innan du fortsätter enligt nedan.
6. Ange namnet på experimentet.
7. I "Cycler selection" (val av cykler) väljer du den cykler som ska användas.
8. Kontrollera att låsringen sitter fast på rätt sätt och bekräfta på skärmen att låsringen är fastsatt.
9. Klicka på knappen "Start run" (starta körning). Körningen av *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR ska nu starta.

## Visa och rapportera qPCR-resultat

1. När körningen har slutförts klickar du på "Finish run" (slutför körning).
2. Visa/låsa upp och godkänna körningen:

- För användare som är inloggade med behörigheten Approver (godkännare): Klicka på "Release and go to approval" (frigör och gå till godkännande).
  - För användare som är inloggade med behörigheten Operator: Klicka på "Release" (visa/lås upp).
3. Om du klickade på "Release and go to approval" (visa/lås upp och fortsatt till godkänna) visas resultaten för experimentet.
  4. Om en användare med behörighet som användare klickade på "Release" (frigör) måste någon med behörigheten "Approver" (godkännare) logga in och välja miljön "Approval" (godkännande).
    - a. Filtrera fram analysen som ska godkännas genom att välja filteralternativ och klicka på knappen "Apply" (tillämpa).
    - b. Markera kryssrutan bredvid det experiment som ska godkännas.
    - c. Klicka på knappen "Start approval" (Starta godkännande).Eftersom experimentet innehåller en kalibrator måste obligatorisk information om kalibratorn anges på fliken "Calibrator" (Kalibrator) innan prover slutligen kan godkännas.
  5. Välj knappen "Use calibrator" (Använd kalibrator) och ange det motsvarande värdet (finns på IS-MMR-kalibratorröret eller på analyscertifikatet).

**Obs:** Du måste ange detta värde två gånger i fälten "Enter calibrator value" (Ange kalibratorvärde) och "Reenter calibrator value" (Ange kalibratorvärde igen).  
Bekräfta de angivna värdena genom att trycka på knappen "Apply" (Tillämpa):  
Resultaten uppdateras.

**Obs:** När minst ett prov har frigjorts kan kalibratorn inte ändras längre.
  6. Granska resultaten och klicka på knappen "Release/Report data" (visa/lås upp/rapportera data).

Klicka på "OK". Rapporten genereras i \*.pdf-format och sparas automatiskt i den fördefinierade mappen.

---

Som standard är sökvägen till denna mapp: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export (Exportera) > Reports (Rapporter)**

**Obs:** Du kan välja en annan mapp i miljön "Configuration" (konfiguration).

**Obs:** För felsökning krävs ett supportpaket från körningen. Supportpaket kan genereras från miljön för godkännande eller arkivering (Användarhandbok till Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application), avsnitt 1.8 "Troubleshooting" (Felsökning), "Creating a support package" (Skapa ett supportpaket)). Dessutom kan historiken från tiden för incidenten  $\pm$  1 dag vara till god hjälp. Historiken finns i Service-miljön (Användarhandboken till Rotor-Gene AssayManager v2.1-huvudprogrammet, avsnitt 1.5.5.5).

7. Ta ut materialet från Rotor-Gene Q MDx-instrumentet och kassera rören på remsa i enlighet med lokala säkerhetsföreskrifter.

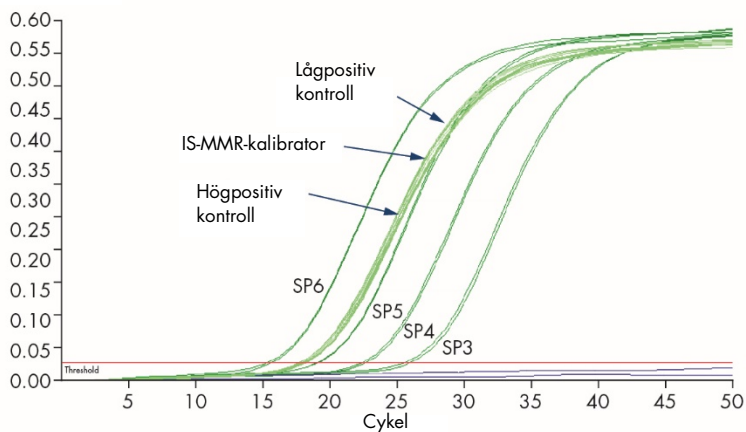
# Tolkning av resultat på RGQ-programvaran

## Princip för dataanalys

Vid användning av TaqMan®-tekniken kallas antalet PCR-cykler som behövs för att detektera en signal över tröskelvärdet för cykeltröskelvärdet ( $C_T$ ), och det är direkt proportionellt mot mängden target som förekommer i början av reaktionen.

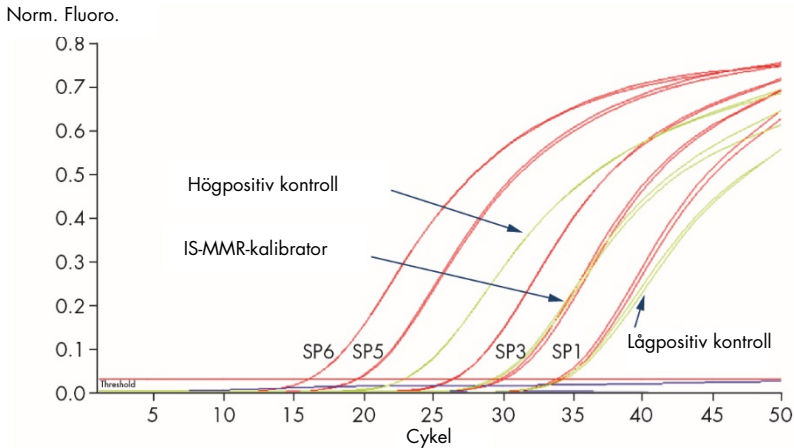
Med hjälp av standarder med ett känt antal molekyler går det att fastställa en standardkurva och bestämma den exakta mängden target som förekommer i testprovet. Standardkurvorna är plasmidbaserade. För att säkerställa korrekta standardkurvor används fyra standardspädningar för ABL1 och fem standardspädningar för Mbc. I kitet ingår även en IS-kalibrator som möjliggör omvandling av resultaten till den internationella skalan. Figur 5 Och Figur 6 visar exempel på TaqMan-amplifieringskurvor som liknar dem som erhålls för standarder, IS-MMR-kalibratoren, den högpositiva RNA-kontrollen och den lågpositiva RNA-kontrollen med *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit.

Norm. Fluoro.



**Figur 5. Detektion av ABL1 med kontrollerna och standarderna SP3, SP4, SP5 och SP6.  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  och  $10^6$  kopior/reaktion.**





**Figur 6. Detektion av BCR-ABL1 MbcR med kontroller och standarderna SP1, SP2, SP3, SP5 och SP6.**  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$  och  $10^6$  kopior/reaktion.

Standardkurvor och kvalitetskriterier som kan tillämpas på rådata

## Reproducerbarhet mellan replikat

Variationen i  $C_T$ -värden mellan replikaten ska vara  $\leq 2$  eller så ska duplikatet ogiltigförklaras utom i följande fall:

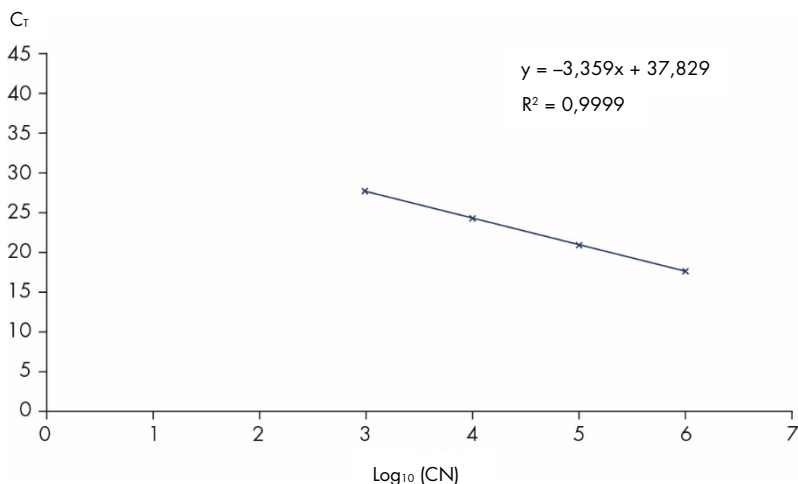
Om medelvärdet för  $C_T \geq 36$  eller om  $C_{T_a} \geq 36$  och  $C_{T_b}$  har statusen "inte detekterad" så gäller inte kriteriet  $\Delta C_T$ ; duplikatet överensstämmer. Om så är fallet ska antalet kopior (CN) som beräknats för  $C_{T_a}$  delas med 2.

**Obs:** Användarna ska mäta reproducerbarheten i sitt laboratorium.

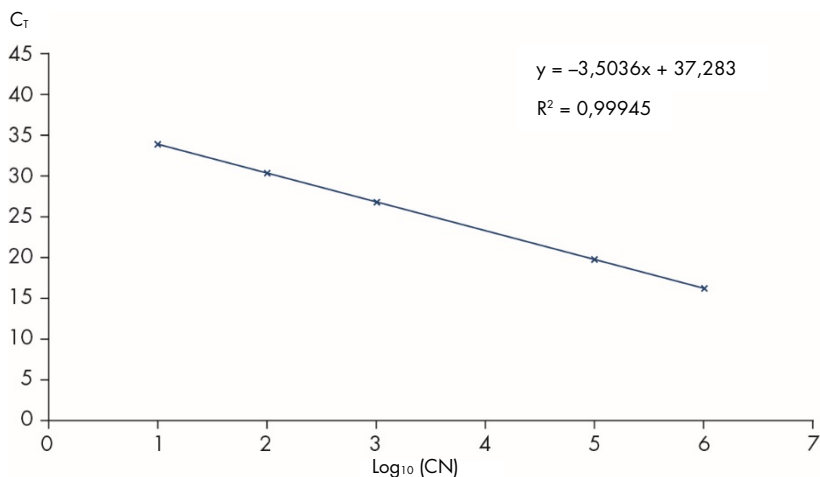
## Standardkurvor

Rådata kan klistras in i en Excel®-fil för analys.

För varje gen (ABL1 och BCR-ABL1 Mbc) ritas  $C_T$ -värden som erhållits från standardspädningar av plasmider upp enligt antalet loggkopior (3, 4, 5 och 6 för SP3, SP4, SP5 och SP6; 1, 2, 3, 5 och 6 för SP1, SP2, SP3, SP5 och SP6). Figur 7 visar ett exempel på en ABL1-kurva som beräknats med fyra standardspädningar. Figur 8 visar ett exempel på en BCR-ABL1 Mbc-kurva som beräknats med fem standardspädningar.



**Figur 7. Standardkurva för ABL1 beräknad på fyra standardspädningar.** En linjär regressionskurva ( $y = ax + b$ ) beräknas där "a" är linjens lutning och "b" är y-interceptet, vilket är y-koordinaten för punkten där linjen korsar y-axeln. Ekvationen och koefficienten för bestämningen ( $R^2$ ) visas i diagrammet.



**Figur 8. Standardkurva för BCR-ABL1 Mbc beräknad på fem standardspädningar.** En linjär regressionskurva ( $y = ax + b$ ) beräknas där "a" är linjens lutning och "b" är y-interceptet, vilket är y-koordinaten för punkten där linjen korsar y-axeln. Ekvationen och koefficienten för bestämningen ( $R^2$ ) visas i diagrammet.

Eftersom standarder är tiofaldiga spädningar är den teoretiska lutningen på kurvan  $-3,3$ . En lutning mellan  $-3,1$  och  $-3,6$  är acceptabel så länge  $R^2$  är  $> 0,95$ . Ett värde för  $R^2 > 0,98$  är dock önskvärt för exakta resultat.

**Obs:** SP1-standardlösningen (BCR-ABL1-plasmid, 10 kopior) måste vara detekterbar för att fastställa standardkurvan för BCR-ABL Mbc.

## Antal kopior (CN)

Ekvationen för standardkurvan för ABL1 eller BCR-ABL1 Mbc ska användas för att omvandla  $C_T$ -råvärden (som erhållits med qPCR Mix ABL1 eller qPCR Mix Mbc för de okända proverna) till antal kopior för ABL1 eller BCR-ABL1 ( $ABL1_{CN}$  eller  $BCR-ABL1 Mbc_{CN}$ ).

$$\text{Log}_{10} \text{ prov ABL1}_{\text{CN}} = \frac{\text{Medelvärde för ABL } C_T - \text{intercept för ABL1-standardskurva}}{\text{Lutning för ABL-standardskurva}}$$

$$\text{Log}_{10} \text{ prov BCR-ABL1 } M_{\text{bcr}}_{\text{CN}} = \frac{\text{Medelvärde för BCR-ABL1 } M_{\text{bcr}} C_T - \text{intercept för BCR-ABL1 } M_{\text{bcr}}\text{-standardskurva}}{\text{Lutning för BCR-ABL1 } M_{\text{bcr}}\text{-standardskurva}}$$

## Kvalitetskontroll på samtliga ABL1<sub>CN</sub>-värden

Dålig RNA-kvalitet eller problem under RT-qPCR kan resultera i lågt antal ABL1-kopior.

För att uppnå optimal sensitivitet för testet ska ABL1<sub>CN</sub> vara lika stort eller större än 100 000 för den högpositiva RNA-kontrollen, den lågpositiva RNA-kontrollen och IS-MMR-kalibratoren.

## RT-negativa kontroller och vattenkontroller

Kontrollen utan mall (NTC) för PCR-steget (vattenkontroll) och omvänd transkription-steget (RT-negativ kontroll) ska ge noll CN för både ABL1 och BCR-ABL1 M<sub>bcr</sub>. Följaktligen ska inget C<sub>T</sub> erhållas eller så ligger C<sub>T</sub>-värdet över interceptet för standardkurvorna. Ett positivt resultat för de här NTC:erna indikerar förekomst av korskontaminering under omvänd transkription och/eller qPCR.

## Normaliserat antal kopior (NCN)

Kvoten av de här CN-värdena ger det normaliserade antalet kopior (NCN):

$$\text{NCN} = \frac{\text{BCR-ABL1 Mbc}_{\text{CN}}}{\text{ABL1}_{\text{CN}}} \times 100$$

Beräkna NCN-resultatet för den högpositiva RNA-kontrollen (NCN<sub>HC</sub>), den lågpositiva RNA-kontrollen (NCN<sub>LC</sub>), IS MMR-kalibratoren (NCN<sub>cal</sub>) och för varje prov (NCN<sub>prov</sub>).

## Kvalitetskontroll av värden för normaliserat antal kopior

Den högpositiva RNA-kontrollen, den lågpositiva RNA-kontrollen och IS-MMR-kalibratoren möjliggör övervakning av den omvända transkriptionen och amplifieringen av ABL1 och BCR-ABL1 Mbc under kvantifieringen av transkriptet.

- NCN-resultatet som erhålls för IS-MMR-kalibratoren, som testats med *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit, måste ligga inom intervallet 0,05–0,3 eftersom NCN-värdena annars inte kan omvandlas till den internationella skalan.
- Sensitiviteten för analysen kan endast bedömas om den lågpositiva RNA-kontrollen detekteras.

## Omvandling till internationell skala

**Obs:** Kontrollera värdet på etiketten till IS-MMR-kalibratorröret eller på certifikatet för analysen som medföljer kitet innan tolkningen. (Kontrollera att samma värde anges på etiketten och på certifikatet.)

Använd det experimentella NCN-resultatet för IS-MMR-kalibratören (NCN<sub>cal</sub>) och dess tilldelade värde (IS-Cal-värde) som anges i analyscertifikatet, för att beräkna det normaliserade kopiaantalet på den internationella skalan (IS-NCN<sub>sample</sub>).

$$\text{IS-NCN}_{\text{sample}} = \frac{\text{NCN}_{\text{prov}} \times \text{IS-Cal-värde}}{\text{NCN}_{\text{cal}}}$$

### Kvalitetskontroll med IS-NCN-värden

- IS-NCN<sub>HC</sub>-resultatet (NCN på den internationella skalan för den högpositiva RNA-kontrollen) ska inte ge någon betydande molekylär respons ("Ingen MMR", se "Rapportering av molekylär respons" nedan).
- IS-NCN<sub>LC</sub>-resultatet (NCN på den internationella skalan för den lågpositiva RNA-kontrollen) ska vara < 0,01 (MR4) för att säkerställa att MR4,5-statusen kan fastställas med säkerhet.

## Rapportering av molekyllär respons

Bestäm statusen för den molekyllära responsen för varje prov enligt tolkningen i Tabell 8.

**Tabell 8. Rapportering av molekyllär respons**

Fall	ABL CN	BCR-ABL1 Mbc CN	IS-NCN-%	Status
1	< 10 000	< 10	–	Dålig kvalitet på provet
2	< 10 000	≥ 10	> 0,1	Ingen MMR
		≥ 10	≤ 0,1	Ofullständig
3	10 000 ≤ CN <sub>ABL</sub> < 32 000	≥ LOD	> 0,1	Ingen MMR
			≤ 0,1	MMR
		LOB < CN < LOD Ersätt CN med LOD	> 0,1	Ingen MMR
			≤ 0,1	MMR
		≤ LOB	–	Inte detekterad/MR4
4	32 000 ≤ CN <sub>ABL</sub> < 100 000	≥ LOD	> 0,1	Ingen MMR
			0,01 < IS ≤ 0,1	MMR
			≤ 0,01	MR4
		LOB < CN < LOD Ersätt CN med LOD	> 0,1	Ingen MMR
			0,01 < IS ≤ 0,1	MMR
			≤ 0,01	MR4
		≤ LOB	–	Inte detekterad/MR4.5
5	100 000 ≤ CN <sub>ABL</sub>	≥ LOD	> 0,1	Ingen MMR
			0,01 < IS ≤ 0,1	MMR
			0,0032 < IS ≤ 0,01	MR4
			≤ 0,0032	MR4,5
		LOB < CN < LOD Ersätt CN med LOD	> 0,1	Ingen MMR
			0,01 < IS ≤ 0,1	MMR
			0,0032 < IS ≤ 0,01	MR4
			≤ 0,0032	MR4,5
	≤ LOB	–	Inte detekterad/MR5	

LOB, limit of blank: blankgräns; LOD, limit of detection: detektionsgräns; MR: molekyllär respons; MMR, major molecular response: betydande molekyllär respons.

## Sammanfattning av kvalitetskriterier

Tabell 9 sammanfattar de olika kvalitetskriterierna och de tillhörande värdena eller resultaten.

**Tabell 9. Sammanfattning av kvalitetskriterier**

Kriterium	Acceptabla värden/resultat
Variationer för $C_T$ -värden mellan replikat	$\leq 2 C_T$ Förutom om medelvärdet för $C_T \geq 36$ eller om $C_{T_a} \geq 36$ och $C_{T_b}$ har statusen "inte detekterad": duplikatet överensstämmer. CN beräknat för $C_{T_a}$ ska delas med 2.
Lutning för standardkurvor	Mellan $-3,1$ och $-3,6$
$R^2$ för standardkurvor	Minst $> 0,95$ (och optimalt $> 0,98$ )
SP1-standardlösning (BCR-ABL1 10-plasmidkopior)	Måste vara detekterbar för att standardkurvan ska kunna fastställas
Kvalitetskontroll av $ABL_{CN}$ -värde för biologiska prover	Referera till Tabell 8
Högpositiv RNA-kontroll, lågpositiv RNA-kontroll och IS-MMR-kalibrator	$ABL_{CN} \geq 100 000$
NTC (vatten) och RTneg-kontroller	För varje $ABL_{CN} = 0$ och $Mbcr_{CN} = 0$ (inget $C_T$ -värde eller $C_T > \text{intercept}$ för standardkurva)
NCN erhållet för IS-MMR-kalibrator ( $NCN_{cal}$ )	Måste ligga inom intervallet $0,05-0,3$
Högpositiv RNA-kontroll	Måste vara detekterbar
Lågpositiv RNA-kontroll	Måste vara detekterbar
IS- $NCN_{HC}$	Status: Ingen betydande molekylär respons
IS- $NCN_{LC}$	$IS-NCN_{LC} \leq 0,01$ (MR4) Måste vara detekterbar för att säkerställa att MR4,5-statusen kan fastställas med säkerhet.

$C_T$ : threshold cycle (cykelträskelvärde); HC: high control (högpositiv kontroll); IS: Internationell standard; LC: låg kontroll; MR: molekylär respons; MMR: major molecular response (betydande molekylär respons); NCN: normalized copy number (normaliserat antal kopior); NTC: No Template Control (Kontroll utan mall); RTneg: reverse transcription negative (negativ omvänd transkription).



# Tolkning av resultat på RGAM-programvaran

Analysen är helt automatisk.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyserar först amplifieringskurvorna, och kan ogiltigförklara avvikande kurvor beroende på deras form och brusamplitud. Om så är fallet associeras en flagga med den ogiltigförklarade kurvan.

Resultaten av testproverna analyseras och ställs in automatiskt av Rotor-Gene AssayManager v2.1 men måste godkännas och frigöras av användaren som är inloggad med rollen som "godkännare". Provresultat som behöver godkännas har tre ytterligare knappar för godkännande i slutet av den dedikerade raden. Dessa knappar används till att acceptera eller avvisa provresultaten. Mer information finns i användarhandbok för Gamma-plugin-programmet.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyserar sedan körningskontrollerna:

- NTC (RT-neg och H<sub>2</sub>O) kontrolleras avseende frånvaro av specifik amplifiering (ABL1 och BCR-ABL1 Mbcf).
- ABL1 och BCR-ABL1 Mbcf SP: Valideringen baseras på R<sup>2</sup>- och lutningsvärdena för dessa båda.
- HC: Antalet ABL1-kopior måste vara stort nog för att den här kontrollen ska kunna tolkas. Om så är fallet kommer procentandelen IS-NCN att beräknas. Den här körningskontrollen valideras om den har statusen No MMR enligt testet.
- LC: Antalet ABL1-kopior måste vara stort nog för att den här kontrollen ska kunna tolkas. Om så är fallet kommer procentandelen IS-NCN att beräknas. Den här körningskontrollen valideras om den har statusen MR4 enligt testet.

- IS-MMR-kalibrator: Antalet ABL1-kopior måste vara stort nog för att den här kontrollen ska kunna tolkas. Om så är fallet kommer NCN att beräknas. Den här körningskontrollen valideras om dess NCN är inom det acceptabla intervallet enligt testet.

**Obs:** Rapporten som genereras i slutet av körningen visar resultaten som erhållits med körningskontroller, med ogiltigförklarande flaggor framför ogiltiga data.

Om alla kontrollerna i körningen överensstämmer kommer Rotor-Gene AssayManager v2.1 att analysera de okända proverna.

I provet måste variationen i  $C_T$ -värden mellan replikat vara tillräckligt låg för att resultaten ska kunna tolkas. Procentandelen IS-NCN beräknas sedan och provstatusen anges.

**Obs:** Om både körningskontrollerna och provresultaten är giltiga, kommer rapporten att visa ABL1- och BCR-ABL1 Mbc-kopieringsnumren, NCN (%), IS-NCN (%) och molekylärresponsstatusen för varje prov.

Tabell 10 och Tabell 11 visas de ogiltigförklarande respektive varnande provflaggor som kan tilldelas enskilda rör av Rotor-Gene AssayManager v2.1 under analysen, tillsammans med en förklaring av vad flaggan betyder.

**Tabell 10. Ogiltigförklarande provflaggor och beskrivning av termer**

Flagga	Beskrivning
ANALYSIS_FAILED (ANALYS MISSLYCKADES)	Analysen är ogiltig eftersom den misslyckades. Kontakta QIAGENS tekniska service.
ASSAY_INVALID (ANALYS OGILTIG)	Analysen är ogiltig eftersom minst en extern kontroll är ogiltig.
CONSECUTIVE_FAULT (KONSEKUTIVT FEL)	Ett mål som användes vid beräkningen av det här målet är ogiltigt.
CURVE_SHAPE_ANOMALY (AVVIKANDE KURVFORM)	Amplifieringskurvan med rådata visar en form som avviker från det etablerade beteendet för den här analysen. Det finns en hög sannolikhet för felaktiga eller feltolkade resultat.
FLAT_BUMP (VÄGBULA)	Amplifieringskurvan med rådata visar en form som liknar en vägbula med svag upphöjning som avviker från det etablerade beteendet för den här analysen. Det finns en hög sannolikhet för felaktiga eller feltolkade resultat (t.ex. felbestämning av C <sub>T</sub> -värdet).
HIGH_PC_HIGH_DELTA_CT (FÖR HÖG VARIATION I CT-VÄRDEN) (ABL eller Mbcr)	Variationen i C <sub>T</sub> -värden mellan replikaten för högpositiv kontroll i kontrollgenblandningen är för hög.
HIGH_PC_HIGH_DELTA_CT (FÖR HÖG VARIATION I CT-VÄRDEN) (Mbcr)	Variationen i C <sub>T</sub> -värden mellan replikaten för högpositiv kontroll i fusionsgenblandningen är för hög.
HIGH_PC_LOW_ABL_CN (FÖR LÅGT ANTAL KONTROLLGENKOPIOR)	Antalet kontrollgenkopior för högpositiv kontroll är för lågt.
HIGH_PC_LOW_IS_NCN (FÖR HÖGT NORMALISERAT ANTAL KOPIOR)	Det normaliserade antalet kopior (internationell skala) för högpositiv kontroll är för lågt.
HIGH_PC_NO_CT (INGET DETEKTERBART CT-VÄRDE) (ABL)	Inget detekterbart C <sub>T</sub> -värde för högpositiv kontroll i kontrollgenblandningen.
HIGH_PC_NO_CT (INGET DETEKTERBART CT-VÄRDE) (Mbcr)	Inget detekterbart C <sub>T</sub> -värde för högpositiv kontroll i fusionsgenblandningen.
HIGH_PC_REPLICATE_NO_CT (REPLIKAT EJ DETEKTERAT) (ABL)	Ett av replikaten för högpositiv kontroll detekterades inte i kontrollgenblandningen.
HIGH_PC_REPLICATE_NO_CT (REPLIKAT EJ DETEKTERAT) (Mbcr)	Ett av replikaten för högpositiv kontroll detekterades inte i fusionsgenblandningen.
INVALID_CALCULATION (OGILTIG BERÄKNING)	Beräkningen för det här målet misslyckades.
IS-CAL_HIGH_DELTA_CT (FÖR HÖG VARIATION I CT-VÄRDEN) (ABL)	Variationen i C <sub>T</sub> -värden mellan replikaten för IS-MMR-kalibrator i kontrollgenblandningen är för hög.

Flagga	Beskrivning
IS-CAL_HIGH_DELTA_CT (FÖR HÖG VARIATION I CT-VÄRDEN) (Mbc <sub>r</sub> )	Variationen i C <sub>T</sub> -värden mellan replikaten för IS-MMR-kalibrator i fusionsgenblandningen är för hög.
IS-CAL_HIGH_NCN (FÖR HÖGT NORMALISERAT ANTAL KOPIOR)	Det normaliserade antalet kopior för IS-MMR-kalibrator är för högt.
IS-CAL_LOW_ABL_CN (FÖR LÅGT ANTAL KONTROLLGENKOPIOR)	Antalet kontrollgenkopior för IS-MMR-kalibrator är för lågt.
IS-CAL_LOW_NCN (FÖR LÅGT NORMALISERAT ANTAL KOPIOR)	Det normaliserade antalet kopior för IS-MMR-kalibrator är för lågt.
IS-CAL_REPLICATE_NO_CT (REPLIKAT EJ DETEKTERAT) (ABL)	Ett av replikaten för IS-MMR-kalibrator detekterades inte i kontrollgenblandningen.
IS-CAL_REPLICATE_NO_CT (REPLIKAT EJ DETEKTERAT) (Mbc <sub>r</sub> )	Ett av replikaten för IS-MMR-kalibrator detekterades inte i fusionsgenblandningen.
LOW_PC_HIGH_DELTA_CT (FÖR HÖG VARIATION I CT-VÄRDEN) (ABL)	Variationen i C <sub>T</sub> -värden mellan replikaten för lågpositiv kontroll i kontrollgenblandningen är för hög.
LOW_PC_HIGH_DELTA_CT (FÖR HÖG VARIATION I CT-VÄRDEN) (Mbc <sub>r</sub> )	Variationen i C <sub>T</sub> -värden mellan replikaten för lågpositiv kontroll i fusionsgenblandningen är för hög.
LOW_PC_HIGH_IS-NCN (FÖR HÖGT NORMALISERAT ANTAL KOPIOR)	Det normaliserade antalet kopior (internationell skala) för lågpositiv kontroll är för högt.
LOW_PC_LOW_ABL_CN (FÖR LÅGT ANTAL KONTROLLGENKOPIOR)	Antalet kontrollgenkopior för lågpositiv kontroll är för lågt.
LOW_PC_NO_CT (INGET DETEKTERBART CT-VÄRDE) (ABL)	Inget detekterbart C <sub>T</sub> -värde för lågpositiv kontroll i kontrollgenblandningen.
LOW_PC_NO_CT (INGET DETEKTERBART CT-VÄRDE) (Mbc <sub>r</sub> )	Inget detekterbart C <sub>T</sub> -värde för lågpositiv kontroll i fusionsgenblandningen.
LOW_PC_REPLICATE_NO_CT REPLIKAT EJ DETEKTERAT) (ABL)	Ett av replikaten för lågpositiv kontroll detekterades inte i kontrollgenblandningen.
LOW_PC_REPLICATE_NO_CT (REPLIKAT EJ DETEKTERAT) (Mbc <sub>r</sub> )	Ett av replikaten för lågpositiv kontroll detekterades inte i fusionsgenblandningen.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING (FLERFALDIGT KORSANDE AV TRÖSKELVÄRDE)	Amplifieringskurvan korsar tröskelvärdet mer än en gång. Ett entydigt C <sub>T</sub> -värde kan inte bestämmas.
NO_BASELINE (INGEN BASELINE)	Ingen initial baseline har hittats. Den efterföljande analysen kan inte utföras.
NTC_UNEXPECTED_VALUE (OVÄNTAT NTC-VÄRDE)	C <sub>T</sub> har detekterats i kontrollen utan mall.
OTHER_TARGET_INVALID (ANNAT MÅL OGILTIGT)	Ett annat mål för samma prov är ogiltigt.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE (UTANFÖR BERÄKNINGSINTERVALLET)	Den beräknade koncentrationen för det här provet överstiger den tekniska gränsen.

Flagga	Beskrivning
RUN_FAILED (KÖRNING MISSLYCKADES)	Analysen är ogiltig eftersom ett problem uppstått med cyklern eller cykleranslutningen.
RUN_STOPPED (KÖRNING STOPPAD)	Analysen är ogiltig eftersom körningen har stoppats manuellt.
SAMPLE_HIGH_DELTA_CT (ABL)	Variationen i $C_T$ -värden mellan testprovsreplikaten i kontrollgenblandningen är för hög.
SAMPLE_HIGH_DELTA_CT (FÖR HÖG VARIATION I CT-VÄRDEN) (Mbc <sub>r</sub> )	Variationen i $C_T$ -värden mellan testprovsreplikaten i fusionsgenblandningen är för hög.
SAMPLE_REPLICATE_NO_CT (REPLIKAT EJ DETEKTERAT) (ABL)	Ett av testprovsreplikaten detekterades inte i kontrollgenblandningen.
SAMPLE_REPLICATE_NO_CT (REPLIKAT EJ DETEKTERAT) (Mbc <sub>r</sub> )	Ett av testprovsreplikaten detekterades inte i fusionsgenblandningen.
SATURATION (MÄTTNAD)	Rådata för fluorescensen mätas kraftigt innan brytpunkten på amplifieringskurvan.
SPIKE_CLOSE_TO_CT (TOPP NÄRA CT)	En topp har detekterats i amplifieringskurvan nära $C_T$ .
SP_HIGH_SLOPE (ÖVRE GRÄNS ÖVERSTIGEN) (ABL)	Den övre gränsen för kontrollgenslutningen har överstigits.
SP_HIGH_SLOPE (ÖVRE GRÄNS ÖVERSTIGEN) (Mbc <sub>r</sub> )	Den övre gränsen för fusionsgenslutningen har överstigits.
SP_LOW_RSQUARED (LÄGRE GRÄNS EJ UPPFYLLD) (ABL)	Den lägre gränsen för kontrollgen- $R^2$ har inte uppfyllts.
SP_LOW_RSQUARED (LÄGRE GRÄNS EJ UPPFYLLD) (Mbc <sub>r</sub> )	Den lägre gränsen för fusionsgen- $R^2$ har inte uppfyllts.
SP_LOW_SLOPE (LÄGRE GRÄNS EJ UPPFYLLD) (ABL)	Den lägre gränsen för kontrollgenslutningen har inte uppfyllts.
SP_LOW_SLOPE (LÄGRE GRÄNS EJ UPPFYLLD) (Mbc <sub>r</sub> )	Den lägre gränsen för fusionsgenslutningen har inte uppfyllts.
SP1_NO_CT (INGET CT-VÄRDE DETEKTERAT) (Mbc <sub>r</sub> )	Inget detekterbart $C_T$ -värde för standardplasmid 1 i fusionsgenblandningen.
STANDARD_HIGH_DELTA_CT (FÖR HÖG VARIATION I CT-VÄRDEN) (ABL)	Variationen i $C_T$ -värden mellan standardreplikaten i kontrollgenblandningen är för hög.
STANDARD_HIGH_DELTA_CT (FÖR HÖG VARIATION I CT-VÄRDEN) (Mbc <sub>r</sub> )	Variationen i $C_T$ -värden mellan standardreplikaten i fusionsgenblandningen är för hög.
STANDARD_REPLICATE_NO_CT (STANDARDREPLIKAT EJ DETEKTERAT) (ABL)	Ett av standardreplikaten detekterades inte i kontrollgenblandningen.

STANDARD\_REPLICATE\_NO\_CT  
(STANDARDREPLIKAT EJ DETEKTERAT) (Mbcf)

Ett av standardreplikaten detekterades inte i fusionsgenblandningen.

STEEP\_BASELINE (BRANT BASLINJE)

En brant stigande baslinje för rådata för fluorescensen har detekterats i amplifieringskurvan.

Flagga	Beskrivning
STRONG_BASELINE_DIP (KRAFTIGT BASLINJEFALL)	Ett kraftigt fall i baslinjen för rådata för fluorescensen har detekterats i amplifieringskurvan.
STRONG_NOISE (HÖGT BRUS)	Högt brus har detekterats utanför tillväxtfasen i amplifieringskurvan.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE (HÖGT BRUS I TILLVÄXTFAS)	Högt brus har detekterats i tillväxtfasen (exponentiella fasen) i amplifieringskurvan.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE (VÅGLIKNANDE BASLINJE FÖR FLUORESCENS)	En vågliknande baslinje för rådata för fluorescensen har detekterats i amplifieringskurvan.

**Tabell 11. Varningsprovflaggor och beskrivning av termer**

<b>Flagga</b>	<b>Beskrivning</b>
CN Mbcr Between LOB and LOD (CN Mbcr mellan LOB och LOD)	Antalet fusionsgenskopior för testprovet ligger mellan LOB- och LOD-värdena och ersätts av LOD-värdet.
CN Mbcr Single Replicate (CN Mbcr Enstaka replikat)	Antalet fusionsgenskopior för testprovet beräknas utifrån ett enda replikat och delas med 2.
CN Mbcr Single Replicate Between LOB and LOD (CN Mbcr Enstaka replikat mellan LOB och LOD)	Antalet fusionsgenskopior för testprovet (beräknat utifrån ett enda replikat och delat med 2) ligger mellan LOB- och LOD-värdena och ersätts av LOD-värdet.
IS-NCN (%) Between LOB and LOD (IS-NCN (%) mellan LOB och LOD)	Det normaliserade antalet kopior (internationell skala) för testprovet erhålls baserat på ett värde för antalet fusionsgenskopior som ligger mellan LOB och LOD.
IS-NCN (%) Single Replicate (IS-NCN (%) Enstaka replikat)	Det normaliserade antalet kopior (internationell skala) för testprovet erhålls baserat på ett värde för antalet fusionsgenskopior som beräknas utifrån ett enda replikat.
IS-NCN (%) Single Replicate Between LOB and LOD (IS-NCN (%) Enstaka replikat mellan LOB och LOD)	Det normaliserade antalet kopior (internationell skala) för testet erhålls baserat på ett värde för antalet fusionsgenskopior (beräknat utifrån ett enda replikat) som ligger mellan LOB- och LOD-värdena.
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE (LÅG FLUORESCENSÄNDRING)	Ändringen av procentandel fluorescens för det här provet i förhållande till det provrör med störst fluorescensändring är lägre än en definierad gräns.
LOW_REACTION_EFFICIENCY (LÅG REAKTIONSEFFEKTIVITET)	Reaktionseffektiviteten för det här provet har inte uppnått en definierad gräns.
NCN (%) Between LOB and LOD (NCN (%) mellan LOB och LOD)	Det normaliserade antalet kopior för testprovet erhålls baserat på ett värde för antalet fusionsgenskopior som ligger mellan LOB och LOD.
NCN (%) Single Replicate (NCN (%) Enstaka replikat)	Det normaliserade antalet kopior för testprovet erhålls baserat på ett värde för antalet fusionsgenskopior som beräknas utifrån ett enda replikat.
NCN (%) Single Replicate Between LOB and LOD (NCN (%) Enstaka replikat mellan LOB och LOD)	Det normaliserade antalet kopior för testprovet erhålls baserat på ett värde för antalet fusionsgenskopior (beräknat utifrån ett enda replikat) som ligger mellan LOB- och LOD-värdena.
SPIKE (TOPP)	En topp i rådatafluorescensen har detekterats i amplifieringskurvan, men utanför det område där $C_T$ bestäms.

# Felsökningshandbok

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som kan uppstå. Mer information finns på sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Dessutom svarar teamet för QIAGENs tekniska service gärna på frågor om informationen och protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (för kontaktinformation, se sista sidan eller besök [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Kommentarer och förslag på åtgärd

---

### RNA-isolering

Information om felsökning av rening av RNA från helblod med RNeasy Midi Kit och Buffer EL finns i de motsvarande handböckerna till kiten.

#### Otillräcklig mängd RNA i eluatet

Otillräcklig mängd blod har använts

Upprepa RNA-isoleringen med fler prover. Du kan även prova att poola båda eluatet och koncentrera RNA med hjälp av RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat.nr 74204).

#### Otillräcklig mängd RNA i eluatet

RNA-koncentrationen måste vara 200 ng/µl för optimal sensitivitet

Använd RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat.nr 74204) för att koncentrera provet och justera koncentrationen till 200 ng/µl.

#### Standard, kontroll eller IS-Cal detekterades inte

- |  |   |
|--|---|
| a) Pipetteringsfel eller utelämnade reagenser; felvända rör eller brunnar    | Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. Upprepa PCR-körningen.  |
| b) Felaktig förvaring av kitkomponenter                                      | Förvara <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit i -30 °C till -15 °C och förvara qPCR Mix ABL1 och qPCR Mix MbcR skyddade mot ljus. Överskrid inte maximalt tre frys-/upptiningscykler. |
| c) Utgångsdatum för <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit har passerat | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se kitetiketten) för reagenserna och använd ett nytt kit om det behövs.   |



## Kommentarer och förslag på åtgärd

---

### Ingen signal, inklusive ingen signal för kontroller

- |   |  |
|---|--|
| a) Inget reaktionsrör i position 1 på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM | Se till att alltid placera ett prov i position 1 på rotorn. Annars utför inte instrumentet någon kalibrering, och felaktiga fluorescensdata erhålls.   |
| b) Pipetteringsfel eller utelämnade reagenser; felvända rör eller brunnar     | Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. Upprepa PCR-körningen.   |
| c) Felaktig förvaring av kitkomponenter                                       | Förvara <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit i $-30$ till $-15^{\circ}\text{C}$ och förvara primers och probmixar i skydd mot ljus. Överskrid inte maximalt tre frys-/upptiningscykler. |
| d) Utgångsdatum för <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit har passerat  | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se kitetiketten) för reagenserna och använd ett nytt kit om det behövs.  |
| e) Felaktig detektionskanal vald  | Ställ in detektionskanalen på Cycling Green eller 470 nm/510 nm.   |
| f) Datahämtningsprogram saknas  | Kontrollera cyklingsprogrammet. Se Tabell 5, sida 35. Välj hämtningsläget "Single" (Enskild) i slutet av varje hybridiseringssegment i PCR-programmet.   |

### Fluorescensintensiteten varierar

- |  |  |
|--|--|
| Pipetteringsfel eller utelämnade reagenser; felvända rör eller brunnar | Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. Upprepa PCR-körningen. |
|--|--|

### Fluorescensintensiteten är för låg

- |  |   |
|--|---|
| a) Felaktig förvaring av kitkomponenter                                      | Förvara kitet <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR i $-30$ till $-15^{\circ}\text{C}$ och förvara qPCR Mix ABL1 och qPCR Mix MbcR skyddade mot ljus. Överskrid inte maximalt tre frys-/upptiningscykler. |
| b) Utgångsdatum för <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit har passerat | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se kitetiketten) för reagenserna och använd ett nytt kit om det behövs.   |
| c) Mycket låg mängd mål-RNA  | Kontrollera alltid RNA-koncentrationen innan start.   |

## Kommentarer och förslag på åtgärd

---

### Negativ kontroll (H<sub>2</sub>O) ger ett positivt resultat

Korskontaminering,  
reagenskontaminering,  
instrumentfel, felvänd brunn  
eller kapillär, eller  
probeförsämring

Byt ut alla kritiska reagenser eller använd ett nytt kit.  
Hantera alltid prover, kitkomponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med god laboratoriesed för att undvika korskontaminering.  
Förvara qPCR Mix ABL1 och qPCR Mix Mbcr skyddat mot ljus.  
Leta efter falskt positiva avläsningar på fluorescenskurvor.  
Kontrollera iordningställandet av reaktionen.

### Tolkning av resultat

Information om felsökning relaterat till Rotor-Gene Q MDx-instrumentet och Rotor-Gene Q-programvaran eller Rotor-Gene AssayManager v2.1-programmet finns i respektive användarhandbok.

## Kvalitetskontroll

Kvalitetskontroll av hela kitet har utförts på ett Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Det här kitet är tillverkat enligt standarden ISO 13485. Analyscertifikat finns tillgängliga på begäran på [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Begränsningar

Det här kitet är avsett för professionell användning.

Produkten är endast avsedd att användas av personal som fått särskild utbildning i molekylärbiologiteknik och är väl förtrogna med detta område.

Kitet ska användas i enlighet med anvisningarna i denna handbok, i kombination med ett validerat instrument som omnämns i "Material som behövs men inte medföljer", sida 12.

---

Var uppmärksam på de utgångsdatum som anges på förpackningens etikett. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat.

Alla reagenser som medföljer *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser som ingår i samma kit. Användning av andra reagenser eller reagenser från andra loter kan påverka prestandan.

*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit är endast validerat för antikoagulerat helblod i kalium-EDTA (K<sub>2</sub>EDTA) från patienter som diagnostiserats med kronisk Philadelphia-kromosompositiv (Ph+) myeloisk leukemi (CML) med p210.

Prestandan hos *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit fastställdes med hjälp av RNeasy Midi Kit (kat.nr 75144), Buffer EL (kat.nr 79217) samt RNeasy MinElute Cleanup Kit (kat.nr 74204) för rengöring och koncentration av RNA.

Endast instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM har validerats för PCR med detta kit.

All användning av produkten tillsammans med andra märken och/eller ändring av komponenterna gör att QIAGENs garanti upphör att gälla.

Alla diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med övriga kliniska fynd eller laboratoriefynd.

Det är användarens ansvar att validera systemegenskaperna för alla de procedurer som används i laboratoriet som inte ingår i QIAGENs egenskapsstudier.

# Prestandaegenskaper

## LOB (limit of blank)

Limit of blank (LOB) fastställdes enligt standarden CLSI/NCCLS EP17-2A på helblodsprover från friska blodgivare (7 prover, 12 mätningar/2 loter).

LOB visade sig vara lika med 1,02 kopior av BCR-ABL1 Mbc-transkript.

## Detektionsgräns (LOD)

Detektionsgräns (limit of detection (LOD) eller analytisk sensitivitet) fastställdes baserat på den "Classical approach" som beskrivs i standarden CLSI/NCCLS EP17-2A. I den här studien analyserades kända lågpositiva prover (sju prover, 12 mätningar/2 loter).

LOD visade sig vara lika med 3,21 kopior av BCR-ABL1 Mbc-transkript eller 0,0030 % IS-NCN.

## Linjäritet

Linjäritet fastställdes enligt standarden CLSI/NCCLS EP6-A med en lot av *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit på nio olika prover som beretts med successiva spädningar av positivt RNA. Det positiva RNA:t extraherades från en cellinje och blandades med negativt RNA från friska personer. Bestämningen utfördes för tre olika RNA-inputs.

Kvantifieringen av BCR-ABL1 Mbc-transkriptet är linjär från LOD-värdet till 56 % IS-NCN så länge koncentrationen på det kvantifierade prov-RNA:t ligger nära 200 ng/μl, vilket är rekommenderad input för analysen (total input 3 μg).

Vid lägre RNA-input kan linjäritetsintervallet minska.

## Repeterbarhet och reproducerbarhet

Precisionsstudien utfördes enligt standarden CLSI/NCCLS EP5-A2. Testning utfördes med nio olika prover som testades 45 gånger i duplikat på 45 körningar som utfördes under 23 dagar, vilket gav upphov till 90 mätningar per prov.

Precisionsresultaten sammanfattas i Tabell 12.

**Tabell 12. Precisionsresultat**

Prov	Medelvärde för BCR-ABL1 MbcR IS-NCN	SDR+	SDRUN++	SDTOTAL+++	CV <sub>TOTAL</sub>
S1	64,5243	4,3105	12,3610	13,0910	20,29%
S2	36,1684	1,7104	5,9078	6,8581	18,96%
S3	6,4876	0,4231	0,7857	1,0941	16,86%
S4	0,7305	0,0512	0,0779	0,1178	16,12%
S5	0,0754	0,0068	0,0073	0,0133	17,62%
S6	0,0075	0,0016	0,0009	0,0022	28,81%
S7	0,0036	0,0014	0,0002	0,0014	38,64%
S8	0,0020	0,0010	0,0000	0,0010	48,71%
S9	0,0011	0,0007	0,0000	0,0007	63,32%

CV<sub>TOTAL</sub>: Variationskoefficient för den totala precisionen (BCR-ABL1 MbcR IS-NCN); SD: standardavvikelse; R+: Repeterbarhet; RUN++: Reproducerbarhet mellan körningar; S: standard; TOTAL+++: Total precision (inklusive mellan instrument, mellan användare och mellan loter).

## Interfererande substanser

Studiens utformning baserades på rekommendationerna i NCCLS-standard EP7-A2 "Interference Testing in clinical Chemistry" (Interferenstest i klinisk kemi). Följande ämnen som potentiellt förekommer i blodprover eller som kan tillföras under rening av RNA valdes för sin potentiella effekt på PCR: okonjugerat bilirubin, konjugerat bilirubin, hemoglobin (humant), serumalbumin (humant), överskott av kalium-EDTA (K2-EDTA), etanol.

---

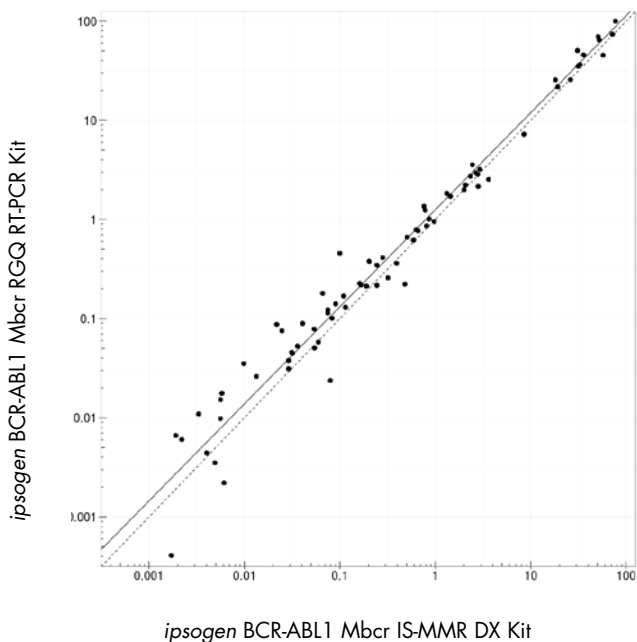
Resultaten som erhöles visade ingen interfererande effekt för dessa substanser.

## Klinisk utvärdering och metodjämförelse

Två studier utfördes för att jämföra *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit med alternativa metoder.

Studie 1: 76 RNA-prover som extraherats från perifert blod analyserades med *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit och *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit.

De uppmätta IS-NCN-värdena från båda metoderna jämfördes med hjälp av Deming-regression. Det fanns en stark korrelation mellan *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit och *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX ( $R^2 = 0,97$ ), vilket visas i Figur 9.



**Figur 9.** Diagram över IS-NCN som erhållits med *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* och *ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit*.

Studie 2: 39 RNA-prover som extraherats från perifert blod hos patienter som tidigare diagnostiserats med Ph+ CML och som behandlades med tyrosinkinashämmare analyserades med *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* och ett laboratorieutvecklat test (referensmetod) på en klinik i Frankrike. Med referensmetoden rapporterades resultat som var standardiserade till den internationella skalan med hjälp av en omvandlingsfaktor.

Kontingenstabellen nedan skapades för att jämföra den kliniska statusen som fastställts med båda metoderna. Det fanns en stark överensstämmelse mellan *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* och referensmetoden (total överensstämmelse = 97,4 %), vilket visas i i Figur 10.

		Referensmetod		n	
		ingen MR 4	MR 4 eller under		
ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit	ingen MR 4	15	1	16	
	MR 4 eller under	0	23	23	
		n	15	24	39

**Figur 10.** Kontingenstabell med jämförelse av *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit och ett laboratorieutvecklat test som standardiserats till den internationella skalan.

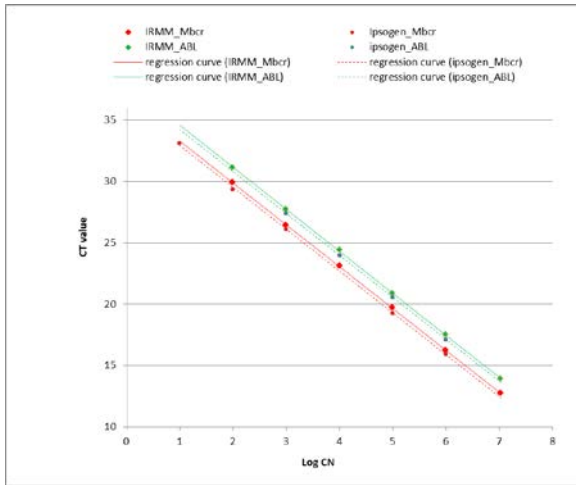
## Studie av överensstämmelse: ERM-AD623 BCR-ABL1-enkelplasmidstandard (IRMM) jämfört med *ipsogen*-enkelplasmidstandard (QIAGEN)

De senaste arbetsdefinitionerna för molekylär respons hos BCR-ABL1 MbcR i CML tillhandahålls av European LeukemiaNet/European Treatment Outcome Study (ELN/EUTOS) Molecular Monitoring Steering Group som rekommenderar användning av ERM-AD623 BCR-ABL1-plasmiden från Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) i Belgien (9).

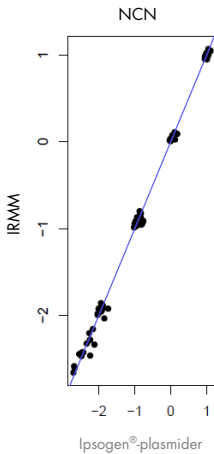
För att följa denna rekommendation genomförde QIAGEN en överensstämmelsestudie och jämförde den multi-target *ipsogen*-enkelplasmid som användes i *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit (24) CE (kat.nr 670923) med ERM-AD623 BCR-ABL1-plasmiden (IRMM).

Jämförelsen baserades på det normaliserade antalet kopior (NCN) för BCR-ABL1 MbcR/ABL1 och bedömde de två standardernas spädningar (*ipsogen* eller ERM-AD623 BCR-ABL1) på kontrollprover som ingår i *ipsogen*-kit och på certifierat referensmaterial från National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) (8). Resultaten visar att de två standardkurvorna bildar parallella linjer (Figur 11) och att NCN-kvoterna är jämförbara (Figur 12).





Figur 11. Jämförelse av *ipsogen*- och ERM-AD623 BCR-ABL1-plasmiderna visar att standardkurvorna bildar parallella linjer.



Figur 12. NCN-värdena för *ipsogen*- och ERM-AD623-plasmiderna är jämförbara.

Slutsatsen av QIAGEN-studien var att det inte finns någon statistiskt signifikant skillnad: ERM-AD623 BCR-ABL1-enkelplasmidstandarden och *ipsogen*-enkelplasmidstandarden ger likvärdiga resultat.

# Referenser

## Citerade referenser

1. Cross, N.C., White, H.E., Müller, M.C., Saglio, G., Hochhaus, A. (2012) Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **26**, 2172.
2. Mahon, F.X., Etienne, G. (2013) Deep molecular response in chronic myeloid leukemia: the new goal of therapy? *Clin. Cancer Res.* **20**, 310.
3. Baccarani, M., Deininger, M.W., Rosti, G., et al. (2013) European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* **122**, 872.
4. Rousselot, P., Charbonnier, A., Cony-Makhoul, P., et al. (2014) Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *J. Clin. Oncol.* **32**, 424.
5. Branford, S., Cross, N.C., Hochhaus, A., 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.
6. Branford, S., Fletcher, L., Cross, N.C., 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.
7. Hughes, T., Deininger, M., Hochhaus, A., 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.
8. White, H.E., Matejtschuk, P., Rigsby, P., et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e1111.
9. Cross, N.C., White, H.E., Colomer, D., et al. (2015) Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **29**, 999.

---

## Användbara referenser

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.












Beillard, E., V.H., 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.

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.

van der Velden, V.H., et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time qPCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.

# Symboler

Följande symboler kan finnas på förpackning och etiketter:

Symbol	Symbolförklaring
	Utgångsdatum
	In vitro-diagnostisk medicinsk produkt
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialnummer
	GS-artikelnummer
	Temperaturbegränsning
	Tillverkare
	Skyddas mot ljus
	Läs bruksanvisningen innan användning
	Försiktighet

# Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat. nr
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit (24)	För 24 reaktioner: Kvantitativa enkelplasmidstandarder för ABL1 och BCR-ABL1 Mbcr, låg- och högpositiva kontroller, IS-MMR-kalibrator, qPCR-mix ABL1, qPCR-mix Mbcr, reagenser för omvänd transkription och qPCR.	670923
<b>Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM – för IVD-validerad realtids-PCR-analys i kliniska tillämpningar</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	PCR-cykler i realtid och analysator med högupplösningssmältning och 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning ingår inte.	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Realtids-PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning ingår.	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Programvara för rutintestning i kombination med Rotor-Gene Q	9024203
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	Programvara med separat licens för installation på en dator	9025620

Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Aluminiumblock för manuell reaktionsinställning med en enkanalspipett i 72 x 0,1 ml rör.	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 remsor med 4 rör med lock för 1 000 reaktioner.	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 remsor med 4 rör och lock för 10 000 reaktioner.	981106
<b>RNA-isolering</b>		
RNeasy Midi Kit	50 RNeasy Midi-spinnkolonner, uppsamlingsrör (15 ml), RNase-fria reagenser och buffertar. För rening av total mängd RNA.	75144
Buffer EL	1000 ml erythrocytlyseringsbuffert.	79217
RNeasy MinElute Cleanup Kit	50 RNeasy MinElute-spinnkolonner, uppsamlingsrör (1,5 ml och 2 ml), RNase-fria reagenser och buffertar. För RNA-rengöring och -koncentration med små elueringsvolymmer.	74204

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive QIAGEN-kithandbok eller -bruksanvisning. Handböcker och bruksanvisningar till QIAGEN Kit finns på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) eller kan beställas från QIAGENS tekniska support eller din lokala återförsäljare.

# Dokumentrevisioner

Dokument	Ändringar	Datum
HB-1904_005	Införande av avsnitten "Automatiserad analys: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med rotor med 72 rör och RGAM-programvara" och "Tolkning av resultat på RGAM-programvaran".	Juni 2018

Den här produkten är avsedd för in vitro-diagnostisk användning. QIAGEN-produkter får inte säljas vidare, modifieras för återförsäljning eller användas för att tillverka kommersiella produkter utan föregående skriftligt medgivande från QIAGEN.

Informationen i det här dokumentet kan komma att ändras utan föregående meddelande. QIAGEN ansvarar inte för eventuella fel i detta dokument. Det här dokumentet förväntas vara fullständigt och korrekt vid tidpunkten för publicering. Under inga omständigheter ska QIAGEN hållas ansvarigt för oavsiktliga, särskilda, multipla eller påföljande skador som uppstår i samband med eller genom användning av det här dokumentet.

QIAGENS produkter uppfyller garanterat sina angivna specifikationer. QIAGENS enda skyldighet och kundens enda rättighet är begränsad till ersättande av produkter kostnadsfritt om produkterna inte fungerar som utlovat.

Köpet av den här produkten ger användaren rätt att utföra diagnostiska analyser för human in vitro-diagnostik. Inget allmänt patent eller licens av något slag förutom den här specifika rättigheten ingår i köpet.

Varumärken: QIAGEN®, *ipsogen*®, MinElute®, RNeasy®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN-gruppen); FAM™, SYBR® (Thermo Fisher Scientific Inc.); BHQ-1® (Biosearch Technologies, Inc); Excel® (Microsoft Corporation); TaqMan® (Roche-gruppen).

#### **Avtal om begränsad licens för *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit**

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och den här handboken och får endast användas med komponenterna som ingår i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Vissa av de här ytterligare protokollen har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. De här protokollen har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Kitet och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuell åtgärd för att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av företagets immateriella rättigheter avseende kitet och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

1114278SV 06/2018 HB-1904-005 © 2016 QIAGEN, med ensamrätt.



---

Beställning [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Teknisk support [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Webbplats [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)