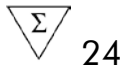


Manual del kit *ipsogen*[®] BCR-ABL1 MbcR IS-MMR



Versión 1

IVD

Diagnóstico in vitro cuantitativo

Para utilizar con los instrumentos Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®], ABI PRISM[®] y LightCycler[®]

CE

REF 670723



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALEMANIA

R3 **MAT** 1072509ES



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN es el proveedor líder de tecnologías innovadoras para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular que permiten el aislamiento y la detección del contenido de cualquier muestra biológica. Nuestros productos y servicios de vanguardia y máxima calidad garantizan el éxito desde la muestra hasta el resultado.

QIAGEN sienta las bases de excelencia en los siguientes campos:

- Purificación de ADN, ARN y proteínas
- Ensayos de ácidos nucleicos y proteínas
- Investigación con microARN y ARNi
- Automatización de tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular

Nuestra misión es ayudarle a superar sus retos y a alcanzar un éxito excepcional. Para más información, visite **www.qiagen.com**.

Contenido

Uso previsto	5
Resumen y descripción	5
Información básica sobre la LMC	5
Seguimiento de la enfermedad	6
Principios del procedimiento	7
Materiales suministrados	10
Contenido del kit	10
Materiales necesarios pero no suministrados	11
Advertencias y precauciones	12
Precauciones generales	13
Almacenamiento y manipulación de los reactivos	14
Manipulación y almacenamiento de las muestras	14
Procedimiento	14
Preparación del ARN de las muestras	14
Protocolos	
■ Transcripción inversa con SuperScript III Reverse Transcriptase	15
■ qPCR en un instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o RotorGene Q 5plex HRM con rotor para 72 tubos	18
■ qPCR en los instrumentos Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS y LightCycler 480	22
■ qPCR en los instrumentos LightCycler 1.2, 1.5 y 2.0	29
Interpretación de los resultados	33
Principio de análisis de los datos	33
Curvas patrón y criterios de calidad aplicables a los datos brutos	34
Número de copias normalizado (NCN)	36
Conversión a la escala internacional (IS) y notificación del resultado de MMR37	
Resumen de los criterios de calidad	39
Guía de resolución de problemas	39
Control de calidad	40
Limitaciones	40
Características del rendimiento	41

Límite de blanco y límite de detección	41
Linealidad	41
Cantidad de muestra	41
Precisión	41
Estudio de concordancia: comparación entre el patrón de plásmido simple ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM) y el patrón de plásmido simple <i>ipsogen</i> (QIAGEN).	42
Referencias bibliográficas	45
Símbolos	46
Información de contacto	46
Información para pedidos	47

Uso previsto

El kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR está concebido para la cuantificación de los transcritos b2a2 o b3a2 de la forma p210 del gen BCR-ABL en muestras de médula ósea o de sangre periférica de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) o leucemia mieloide crónica (LMC) previamente diagnosticados de un acontecimiento de gen de fusión (FG, *fusion gene*) BCR-ABL Mbcr. La prueba está indicada para evaluar el nivel de respuesta molecular; los resultados pueden utilizarse para el seguimiento de una enfermedad residual mínima.

Resumen y descripción

Información básica sobre la LMC

La LMC pertenece al grupo de las neoplasias mieloproliferativas y en > 90% de los casos se caracteriza por la presencia del cromosoma Filadelfia (cromosoma Ph).

Este cromosoma es el producto de una traslocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, t(9;22), en la que el gen BCR (*breakpoint cluster region*, región de fractura) se encuentra en el cromosoma 22 y el oncogén c-ABL procede del cromosoma 9. El gen de fusión correspondiente, BCR-ABL, es transcrito en una molécula de ARNm de 8,5 kb, con 2 variantes de unión, b2a2 (40% de los casos) y b3a2 (55% de los casos). Codifica una proteína quimérica, p210, que posee una elevada actividad tirosinquinasa. Los transcritos b2a3 y b3a3 representan menos del 5% de los casos. El cromosoma Ph también puede detectarse en el 35% de los pacientes adultos que padecen LLA.

La incidencia anual de la LMC es de aproximadamente 1-2 por 100.000, y la LMC representa el 20% de las leucemias del adulto. Se caracteriza clínicamente por un exceso de células mieloides que se diferencian y funcionan normalmente. Los pacientes con LMC son diagnosticados en el 90-95% de los casos en la fase crónica o estable de la enfermedad. Históricamente, en un plazo medio de 4 a 6 años, los pacientes entraban en una fase acelerada que daba lugar a una crisis blástica y a leucemia aguda, que siempre es mortal. La aparición del imatinib y, más recientemente, de los inhibidores de la tirosinquinasa (TKI, *tyrosine kinase inhibitors*) de segunda generación, ha cambiado drásticamente la evolución natural de la enfermedad: la mayoría de los pacientes se mantiene ahora en remisión y requiere un seguimiento y un control de la enfermedad a largo plazo.

Seguimiento de la enfermedad

Hasta ahora, el objetivo del tratamiento de la LMC es alcanzar una supervivencia del 100% y la negatividad para el cromosoma Ph. Por consiguiente, el seguimiento de la enfermedad es un instrumento esencial para evaluar la respuesta al tratamiento y detectar una recidiva temprana en cada paciente. Con el tratamiento con TKI, los pacientes suelen experimentar una progresión de remisión hematológica a remisión citogenética y, después, a remisión molecular, que se corresponden con una reducción del número de células leucémicas y de transcritos del gen BCR-ABL según se detalla en la figura 1 a continuación.

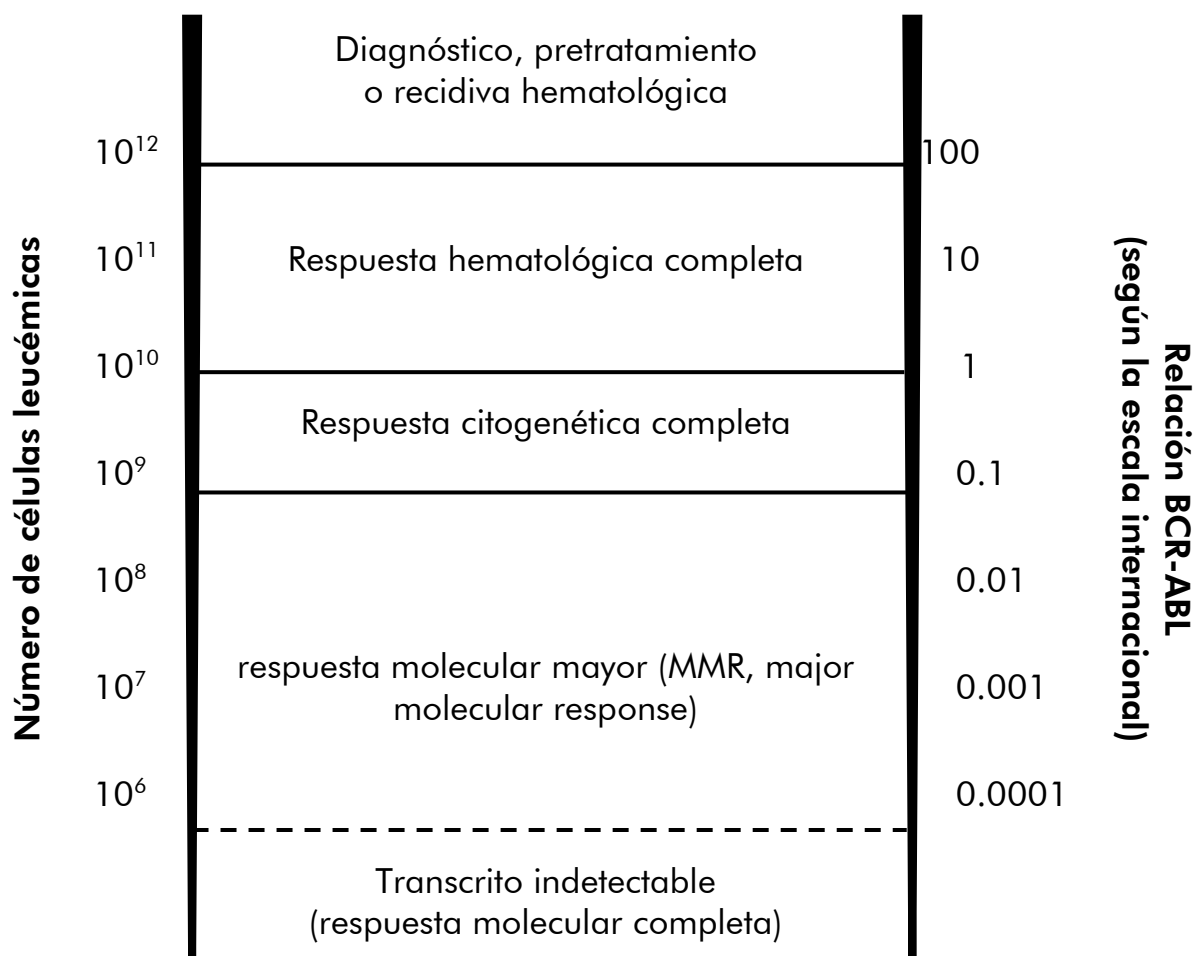


Figura 1. Adaptada de la referencia 1.

El método habitual para calcular la carga tumoral en los pacientes con LMC es el análisis citogenético convencional (patrón de bandas G) en metafases de la médula ósea (BM, *bone marrow*). La respuesta citogenética se evalúa en al menos 20 metafases de la médula ósea. El nivel de respuesta citogenética se calcula en función del porcentaje de metafases con positividad para el cromosoma Ph (véase la tabla 1, referencia 2). Sin embargo, esta evaluación

depende de los rendimientos de laboratorio y tiene una sensibilidad baja (5% cuando se analizan 20 metafases).

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR, *quantitative polymerase chain reaction*) en tiempo real para cuantificar el ARNm de BCR-ABL Mbc en muestras de sangre periférica (PB, *peripheral blood*) forma parte actualmente de las técnicas de seguimiento de la enfermedad para la LMC sometida a tratamiento. Esta técnica es menos invasiva y más sensible que la citogenética convencional de metafases de la médula ósea.

Además, recientemente se han actualizado las recomendaciones para el seguimiento de la LMC para incorporar nuevos datos clínicos así como objetivos e instrumentos mejorados para el seguimiento de la enfermedad. Las recomendaciones más recientes en relación con la definición de la respuesta y el seguimiento de los pacientes tratados con imatinib proceden de expertos de la European LeukemiaNet (ELN) (2).

Desde un punto de vista técnico, expertos internacionales han intentado armonizar el análisis de BCR-ABL Mbc y la notificación del resultado de dicho análisis (3-5). Además, recientemente se ha validado un grupo de referencia bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para permitir una normalización sencilla de la cuantificación del gen BCR-ABL (6).

Principios del procedimiento

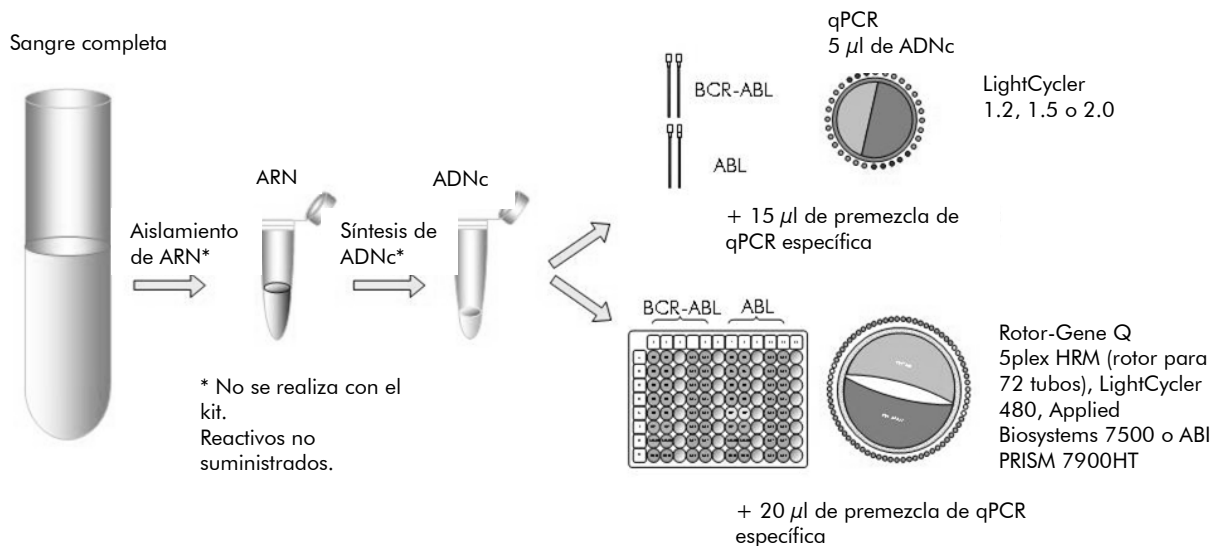


Figura 2. Aislamiento de ARN, síntesis de ADNc y qPCR.

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR, *quantitative polymerase chain reaction*) permite la cuantificación exacta de los productos de la PCR durante la fase exponencial del proceso de amplificación con PCR. Es posible obtener rápidamente datos de la PCR cuantitativa sin necesidad de un procesamiento posterior a la PCR mediante la detección en tiempo real de señales fluorescentes durante los ciclos de PCR y después de estos, reduciendo

así considerablemente el riesgo de contaminación con productos de la PCR. Actualmente se dispone de 3 tipos principales de técnicas de qPCR: análisis de qPCR con colorante SYBR[®] Green I, análisis de qPCR con sondas de hidrólisis y análisis de qPCR con sondas de hibridación.

Este ensayo aprovecha el principio de la hidrólisis de oligonucleótidos con doble colorante para qPCR. Durante la PCR, primers directos e inversos se hibridan con una secuencia específica. La misma mezcla contiene un oligonucleótido con doble colorante. Esta sonda, que consta de un oligonucleótido marcado con un colorante indicador en el extremo 5' y un colorante extintor de fluorescencia en el extremo 3', se hibrida con una secuencia diana dentro del producto de la PCR. El análisis de qPCR con sondas de hidrólisis aprovecha la actividad exonucleasa 5'→3' de la ADN-polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq). Cuando la sonda está intacta, la proximidad del colorante indicador al colorante extintor de fluorescencia provoca la supresión de la fluorescencia del indicador principalmente por transferencia de energía de tipo Förster.

Durante la PCR, si la diana que nos interesa está presente, la sonda hibrida específicamente entre el primer directo y el inverso. La actividad exonucleasa 5'→3' de la ADN-polimerasa escinde la sonda entre el indicador y el extintor de fluorescencia únicamente si la sonda se hibrida con la diana. A continuación, los fragmentos de la sonda se separan de la diana y continúa la polimerización de la cadena. Se bloquea el extremo 3' de la sonda para impedir la extensión de la sonda durante la PCR (figura 3). Este proceso ocurre en todos los ciclos y no interfiere en la acumulación exponencial del producto.

El aumento de la señal de fluorescencia se detecta únicamente si la secuencia diana es complementaria a la sonda y, por consiguiente, se amplifica durante la PCR. Debido a estos requisitos, no se detecta una amplificación inespecífica. Por tanto, el aumento de la fluorescencia es directamente proporcional a la amplificación de la diana durante la PCR.

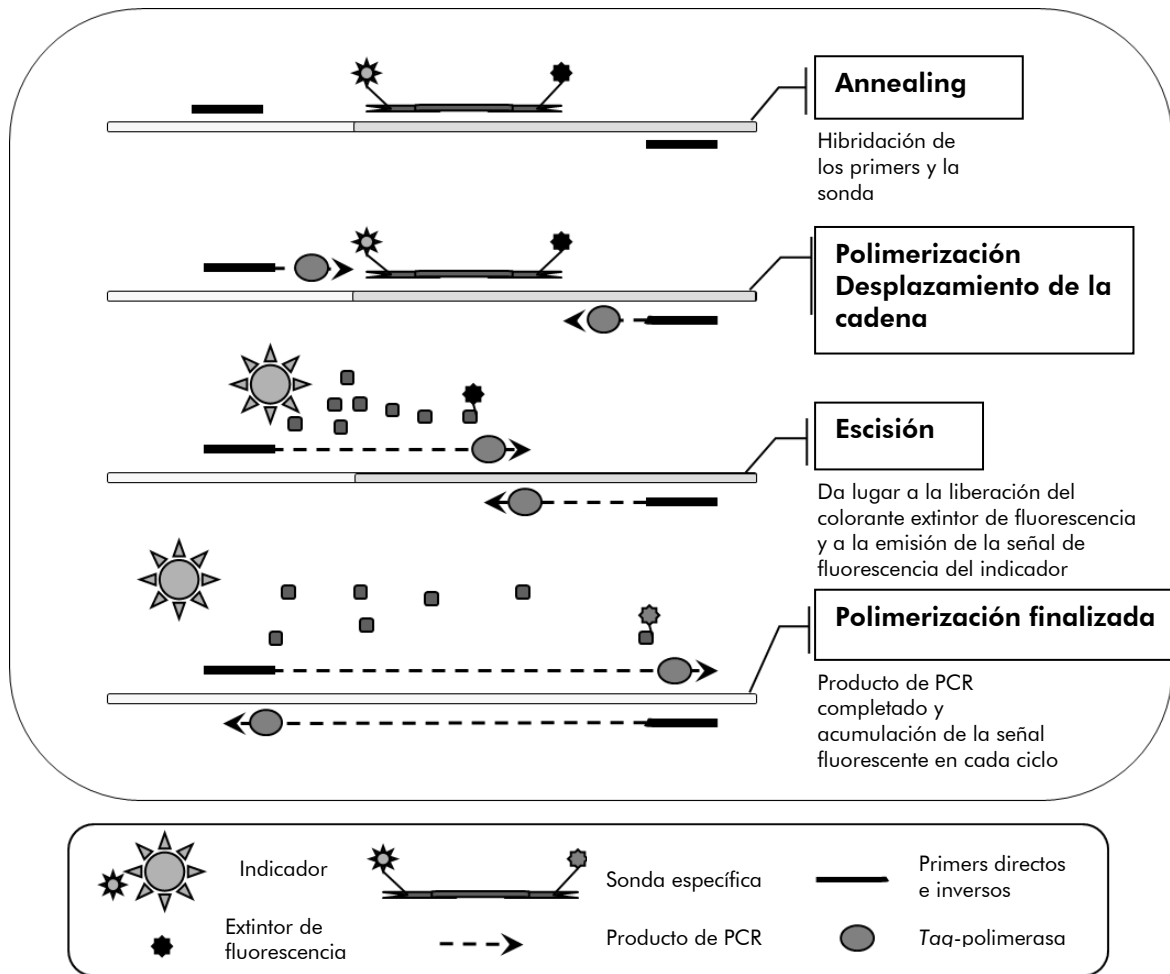


Figura 3. Principio de la reacción. El ARN total se somete a transcripción inversa y el ADNc generado se amplifica mediante PCR utilizando un par de primers específicos y una sonda interna de doble colorante específica (FAM™ -TAMRA™). La sonda se une al amplicón durante cada paso de annealing de la PCR. Cuando el gen *Taq* se extiende desde el primer unido al amplicón, desplaza el extremo 5' de la sonda, que a continuación es degradada por la actividad exonucleasa 5'→3' de la ADN polimerasa *Taq*. La escisión continúa hasta que la sonda restante se separa del amplicón. Este proceso libera el fluoróforo y el extintor de fluorescencia a la solución, separándolos espacialmente y produciendo un aumento de la fluorescencia procedente del colorante FAM y una disminución de la fluorescencia procedente del colorante TAMRA.

Materiales suministrados

Contenido del kit

ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit		(24)
N.º de referencia		670723
Número de reacciones		24
High Positive RNA Control (control positivo alto de ARN)		3 x 10 µl
IS-MMR Calibrator (calibrador IS-MMR)		3 x 10 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (dilución patrón de plásmido simple de Mbcr y ABL) (10 ¹ copias/5 µl)	SP1-BCR-ABL Mbcr & ABL	35 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (dilución patrón de plásmido simple de Mbcr y ABL) (10 ² copias/5 µl)	SP2-BCR-ABL Mbcr & ABL	35 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (dilución patrón de plásmido simple de Mbcr y ABL) (10 ³ copias/5 µl)	SP3-BCR-ABL Mbcr & ABL	70 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (dilución patrón de plásmido simple de Mbcr y ABL) (10 ⁴ copias/5 µl)	SP4-BCR-ABL Mbcr & ABL	35 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (dilución patrón de plásmido simple de Mbcr y ABL) (10 ⁵ copias/5 µl)	SP5-BCR-ABL Mbcr & ABL	70 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (dilución patrón de plásmido simple de Mbcr y ABL) (10 ⁶ copias/5 µl)	SP6-BCR-ABL Mbcr & ABL	70 µl
Primers and Probe Mix ABL* (mezcla de primers y sonda para ABL)	PPC-ABL 25x	110 µl

*Mezcla de primers inversos y directos específicos para el gen de control ABL y una sonda FAM-TAMRA específica.

ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit	(24)
N.º de referencia	670723
Número de reacciones	24
Primers and Probe Mix BCR-ABL MbcR Fusion Gene* (mezcla de primers y sonda para el gen de fusión BCR-ABL MbcR)	PPF-MbcR 25x 110 µl
ipsogen <i>BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit Handbook</i> (inglés)	1

* Mezcla de primers inversos y directos específicos para el gen de fusión BCR-ABL MbcR y una sonda FAM-TAMRA específica.

Nota: Mezclar con cuidado y centrifugar brevemente los patrones (SP1-SP6) y las mezclas de primers y sonda antes de su empleo.

Materiales necesarios pero no suministrados

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad (SDS, safety data sheets) correspondientes, que podrá solicitar al proveedor del producto.

Reactivos

- Reactivos para la purificación del ARN: los reactivos validados son RNeasy® Midi Kit (QIAGEN, n.º de referencia 75144) o TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., n.º de referencia 15596018 o 15596026).
- Agua libre de nucleasas apta para PCR
- Tampón y ADN-polimerasa *Taq*: los reactivos validados son *Premix Ex Taq™* DNA Polymerase (Perfect Real Time) (TaKaRa, n.º de referencia RR039A) y *Premix Ex Taq* DNA Polymerase (Probe qPCR) (TaKaRa, n.º de referencia RR390A). Ambos incluyen mezcla maestra de ADN-polimerasa *Taq* 2x y colorantes de referencia ROX™.
- Reactivos para la transcripción inversa: los reactivos validados son *ipsogen* RT Kit, que incluye transcriptasa inversa, tampón para RT 5x, DTT 100 mM, inhibidor de ARNasa, primer aleatorio y dNTPs (QIAGEN, n.º de referencia 679923); o SuperScript® III Reverse Transcriptase, que incluye transcriptasa inversa, tampón de primera cadena 5x y DTT 100 mM (Thermo Fisher Scientific Inc., n.º de referencia 18080044).
- Si se utiliza SuperScript III, se requieren los siguientes reactivos adicionales:

- Inhibidor de ARNasa: el reactivo validado es el inhibidor de ribonucleasas recombinante RNaseOUT™ (Thermo Fisher Scientific Inc., n.º de referencia 10777019).
- Juego de dNTP para PCR
- Nonúmero aleatorio

Consumibles

- Puntas de pipeta para PCR estériles, libres de nucleasas, resistentes a aerosoles y con filtros hidrófobos
- Tubos para PCR libres de ARNasa y de ADNasa de 0,5 ml o 0,2 ml
- Hielo

Equipo

- Pipetas graduadas en microlitros* dedicadas exclusivamente para PCR (1-10 μ l; 10-100 μ l; 100-1000 μ l)
- Centrifugadora de mesa* con rotor para tubos de reacción de 0,5 ml/0,2 ml (con capacidad para centrifugar a 10.000 rpm)
- Instrumento de PCR en tiempo real*: Rotor-Gene Q 5plex u otro instrumento RotorGene, LightCycler 1.2, 1.5, 2.0 o 480, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS y sus correspondientes materiales específicos
- Termociclador* o baño María* (paso de transcripción inversa)

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico in vitro

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las correspondientes hojas de datos de seguridad (SDS). Dichas hojas están disponibles en internet en un formato PDF cómodo y compacto en www.qiagen.com/safety, donde podrá encontrar, ver e imprimir la hoja de datos de seguridad correspondiente a cada kit y a cada componente del kit de QIAGEN.

Elimine los desechos de las muestras y del ensayo de conformidad con la normativa local sobre seguridad.

* Asegúrese de que los instrumentos hayan sido verificados y calibrados siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Precauciones generales

Los análisis de qPCR exigen buenas prácticas de laboratorio, incluidas las relativas al mantenimiento del equipo, que sean específicas para laboratorios de biología molecular y que cumplan los reglamentos vigentes y las normas aplicables.

Este kit está indicado para uso diagnóstico *in vitro*. Los reactivos y las instrucciones suministrados con este kit han sido validados para ofrecer un rendimiento óptimo. La dilución excesiva de los reactivos o un cambio en los tiempos y las temperaturas de incubación pueden causar resultados erróneos o dispares. Los reactivos PPC y PPF pueden alterarse si se exponen a la luz. Todos los reactivos están formulados de manera específica para su utilización en este análisis. No deben sustituirse si se desea obtener un resultado óptimo del análisis.

La determinación de los niveles de transcritos mediante qPCR requiere la transcripción inversa del ARNm y la amplificación del ADNc generado mediante PCR. Por consiguiente, todo el procedimiento del ensayo debe realizarse en condiciones libres de ARNasa/ADNasa.

Tenga la máxima precaución para evitar:

- Contaminación con ARNasa/ADNasa, que podría degradar el molde de ARNm y el ADNc generado.
- Contaminación por arrastre del ARNm o de los productos de la PCR, que podría producir señales positivas falsas.

Por lo tanto, recomendamos lo siguiente:

- Utilizar material de laboratorio (como pipetas, puntas de pipeta, tubos de reacción) libre de nucleasas y llevar guantes cuando se realice el ensayo.
- Usar puntas de pipeta resistentes a los aerosoles nuevas en todos los pasos del pipeteo para evitar la contaminación cruzada entre las muestras y los reactivos.
- Preparar la premezcla maestra para PCR con material específico (pipetas, puntas, etc.) en una zona dedicada exclusivamente a tal fin donde no se introduzcan matrices de ADN (ADNc, ADN, plásmidos). Añadir el molde en una zona aparte (preferiblemente en una sala independiente) con material específico (pipetas, puntas, etc.).
- Manipular los patrones (SP1-SP6) en una sala independiente.

* Asegúrese de que los instrumentos hayan sido verificados y calibrados siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Almacenamiento y manipulación de los reactivos

Los kits se envían en nieve carbónica y deben conservarse entre -30 °C y -15 °C tras su recepción.

- Reducir al mínimo la exposición a la luz de las mezclas de primers y sonda (tubos de PPC y PPF).
- Mezclar suavemente y centrifugar los tubos antes de abrirlos.
- Guardar todos los componentes del kit en los envases originales.

Estas condiciones de almacenamiento se aplican a los componentes abiertos y a los no abiertos. El incumplimiento de las condiciones de almacenamiento de los componentes que aparecen indicadas en las etiquetas podría afectar negativamente a los resultados del ensayo.

La fecha de caducidad de cada reactivo figura en las etiquetas de cada componente. El producto mantendrá su rendimiento hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta si se respetan las condiciones de almacenamiento correctas.

No hay señales obvias que indiquen inestabilidad de este producto. No obstante, deben realizarse simultáneamente controles positivos y negativos con especímenes desconocidos.

Manipulación y almacenamiento de las muestras

Las muestras de sangre completa deben someterse a anticoagulación con EDTA potásico y conservarse a una temperatura de 2-8 °C durante un período máximo de 5 días antes de la extracción del ARN.

Procedimiento

Preparación del ARN de las muestras

La preparación del ARN a partir de las muestras de pacientes (sangre o médula ósea) debe haberse realizado con un procedimiento validado. La calidad del ensayo depende en gran medida de la calidad del ARN de la muestra. Por consiguiente, recomendamos validar el ARN purificado mediante electroforesis en gel de agarosa*, utilizando un instrumento Agilent® Bioanalyzer®, o mediante espectrofotometría antes del análisis.†

Protocolo: transcripción inversa con SuperScript III Reverse Transcriptase

Este protocolo está indicado para la transcripción inversa con SuperScript III Reverse Transcriptase. Si se utiliza el kit *ipsogen* RT, siga el protocolo descrito en el *Manual del kit ipsogen RT*.

Antes de comenzar

- Preparar dNTP, 10 mM cada uno. Conservar a -25 °C en partes alícuotas.

Procedimiento

1. **Descongelar todos los componentes necesarios y colocarlos en hielo.**
2. **Mezclar bien (no en vórtex) y centrifugar brevemente (durante aproximadamente 10 sa 10.000 rpm, para recoger el líquido en el fondo del tubo). A continuación, conservar en hielo.**
3. **Ajustar las muestras de ARN a 0,1 µg/µl. Pipetear 10 µl (1 µg) de cada muestra de ARN en tubos etiquetados diferentes. Pipetear 10 µl del control positivo alto para ARN, 10 µl del calibrador IS-MMR y 10 µl de agua libre de nucleasas (como control negativo de RT) en tubos etiquetados diferentes y procesarlos en paralelo con las muestras de ARN, tal como se describe a continuación.**
4. **Incubar cada muestra, control y calibrador (10 µl de cada) durante 5 min a 65 °C y enfriar inmediatamente en hielo durante 5 min.**
5. **Centrifugar brevemente (durante aproximadamente 10 segundos a 10.000 rpm, para recoger el líquido en el fondo del tubo). A continuación, conservar en hielo.**
6. **Preparar la siguiente mezcla de RT según el número de muestras, controles y calibradores que vayan a procesarse (tabla 1).**

* Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras.

† Densidad óptica (OD, *optical density*) medida a 260 y 280 nm: un valor de OD de 1,0 a 260 nm equivale a unos 40 µg/ml de ARN monocatenario. Un cociente A_{260}/A_{280} entre 1,8 y 2,1 indica un ARN de alta purificación.

Tabla 1. Preparación de la mezcla de RT.

Componente	Volumen por muestra (μl)	Concentración final
Tampón First-Strand, 5x (suministrado con transcriptasa inversa SuperScript III)	5,0	1x
dNTP (10 mM cada uno, que se prepararán previamente y se conservarán a -20 °C en partes alícuotas)	2,0	0,8 mM
Nonámero aleatorio (100 μ M)	5,25	21 μ M
RNaseOUT (40 U/ μ l)	0,5	0,8 U/ μ l
Transcriptasa inversa SuperScript III (200 U/ μ l)	1,0	8 U/ μ l
DTT (suministrado con transcriptasa inversa SuperScript III)	1,25	–
Muestra de ARN calentada, control o calibrador IS-MMR (se añaden en el paso 7)	10,0	40 ng/ μ l
Volumen final	25,0	–

- 7. Pipetear 15 μ l de mezcla de RT en cada tubo para PCR. A continuación, agregar 10 μ l (1 μ g) de ARN de la muestra, control o calibrador (procedentes del paso 4).**
- 8. Mezclar con cuidado (no en vórtex) y centrifugar brevemente (durante aproximadamente 10 s a 10.000 rpm, para recoger el líquido en el fondo del tubo).**
- 9. Programar el termociclador con el programa de transcripción inversa según se indica en la tabla 2.**

Tabla 2. Perfil de temperatura.

Transcripción inversa 2	Temperatura: 25 °C Tiempo: 10 min
Transcripción inversa 2	Temperatura: 50 °C Tiempo: 60 min
Inactivación	Temperatura: 85 °C Tiempo: 5 min
Refrigeración	Temperatura: 4 °C Tiempo: 5 min

- 10. Colocar los tubos en el termociclador e iniciar el programa de termociclado según se indica en la tabla 2.**
- 11. Una vez finalizado el programa, centrifugar brevemente los tubos (durante aproximadamente 10 s a 10.000 rpm, para recoger el líquido en el fondo del tubo). Mantener los tubos en hielo o a -20 °C hasta que se realice la qPCR, con arreglo a los siguientes protocolos, según el instrumento de qPCR.**

Nota: Para los instrumentos LightCycler 1.2, 1.5 y 2.0, cada preparación de RF proporciona ADNc para dos series de qPCR.

Protocolo: qPCR en un instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o RotorGene Q 5plex HRM con rotor para 72 tubos

Utilizando este instrumento, recomendamos realizar todas las mediciones por duplicado, según se indica en la tabla 3. El kit está diseñado para analizar 8 muestras de ADNc diferentes en el mismo experimento 3 veces.

Tabla 3. Número de reacciones para los instrumentos Rotor-Gene Q con rotor para 72 tubos.

Muestras	Reacciones
Con la mezcla de primers y sonda para ABL (PPC-ABL) (32 reacciones)	
8 muestras de ADNc	8 x 2 reacciones
1 control positivo alto de ADNc	2 reacciones
1 calibrador IS-MMR para ADNc	2 reacciones
Patrones de plásmido simple	2 x 4 reacciones (SP3, SP4, SP5 y SP6, cada uno analizado por duplicado)
Control negativo de RT	2 reacciones
Control de agua	2 reacciones
Con la mezcla de primers y sonda para BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc) (32 reacciones)	
8 muestras de ADNc	8 x 2 reacciones
1 control positivo alto de ADNc	2 reacciones
1 calibrador IS-MMR para ADNc	2 reacciones
Patrones de plásmido simple	2 x 5 reacciones (SP1, SP2, SP3, SP5 y SP6, cada uno analizado por duplicado)
Control de agua	2 reacciones

Procesamiento de las muestras en instrumentos Rotor-Gene Q con rotor para 72 tubos

Recomendamos analizar como mínimo 8 muestras de ADNc en el mismo experimento para optimizar el uso de los patrones y de las mezclas de primers y sonda. El esquema del rotor representado en la figura 4 muestra un ejemplo de este experimento.

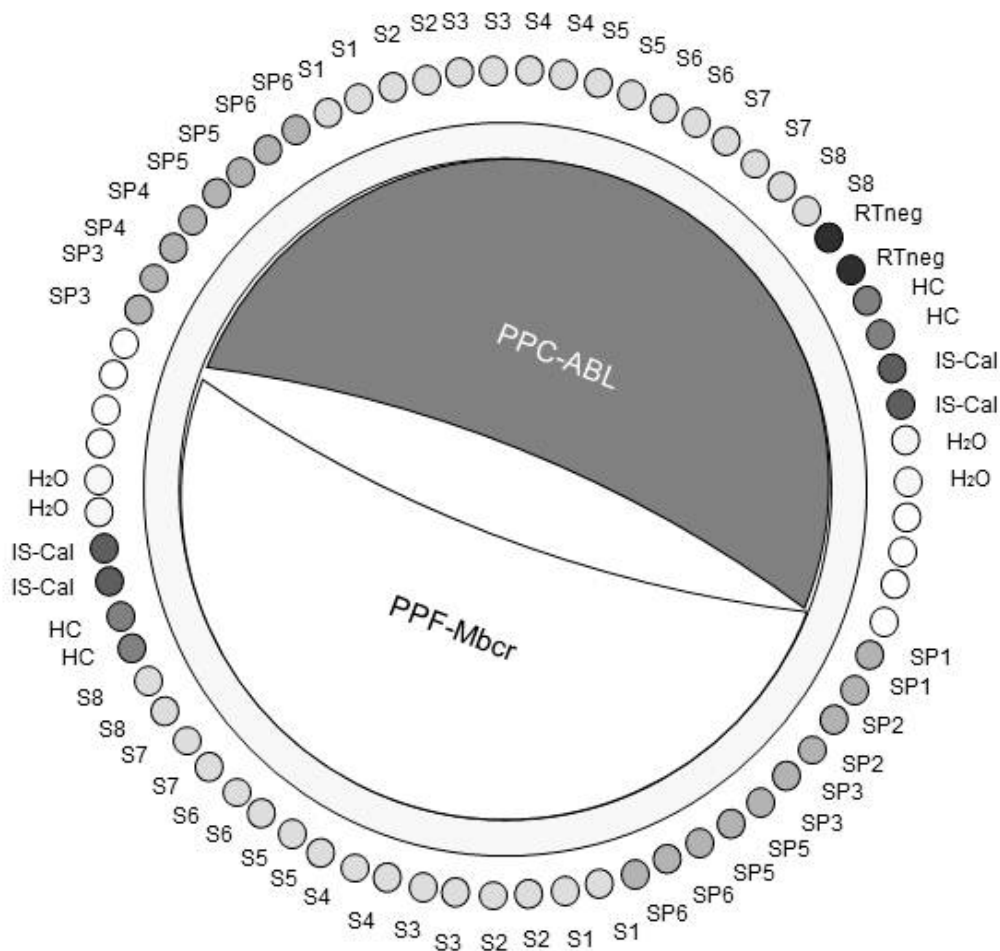


Figura 4. Disposición recomendada del rotor para cada experimento con el kit *ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR*. SP1-SP6: patrones de BCR-ABL Mbcr y ABL; **HC:** control positivo alto de ADNc; **IS-Cal:** calibrador IS-MMR; **RTneg:** control negativo de RT; **S:** muestra de ADNc; **H₂O:** control de agua.

Nota: Asegúrese de colocar siempre una muestra de análisis en la posición 1 del rotor. De lo contrario, el instrumento no se calibrará durante la fase de calibración y se obtendrán datos de fluorescencia incorrectos.

Colocar tubos vacíos en todas las demás posiciones.

qPCR en instrumentos Rotor-Gene Q con rotor para 72 tubos

Nota: Realice todos los pasos en hielo.

Procedimiento

1. **Descongelar todos los componentes necesarios y colocarlos en hielo.**
2. **Mezclar en vórtex los tubos de patrones, PPF-Mbcr y PPC-ABL, y centrifugar brevemente (durante aproximadamente 10 s a 10.000 rpm, para recoger el líquido en el fondo del tubo).**
3. **Preparar la siguiente mezcla de qPCR según el número de muestras que vayan a procesarse.**

Todas las concentraciones se refieren al volumen final de la reacción.

En la tabla 4 se describe el esquema de pipeteo para la preparación de una mezcla de reactivos, calculada para lograr un volumen de reacción final de 25 μ l. Puede prepararse una premezcla según el número de reacciones utilizando la misma mezcla de primers y sonda (PPC-ABL o PPF-Mbcr). Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

Tabla 4. Preparación de la mezcla de qPCR.

Componente	1 reacción (μ l)	BCR-ABL		Concentración final
		ABL: 32 + 1 reacciones (μ l)	Mbcr: 32 + 1 reacciones (μ l)	
Premix Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Mezcla de primers y sonda, 25x	1	33	33	1x
Agua libre de nucleasas apta para PCR	6,5	214,5	214,5	–
Muestra (se añadirá en el paso 5)	5	5 para cada una	5 para cada una	–
Volumen total	25	25 para cada una	25 para cada una	–

4. **Poner 20 μ l de la premezcla de qPCR por tubo.**
5. **En un área diferente del laboratorio con un equipo dedicado exclusivamente, agregar 5 μ l del producto de RT (ADNc, equivalente a 200 ng de ARN) obtenido en el proceso de transcripción inversa**

(véase “Protocolo: transcripción inversa con SuperScript III Reverse Transcriptase”, página 15) en el tubo correspondiente (volumen total, 25 µl).

6. Mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo.
7. Cerrar todos los tubos y colocarlos en el termociclador conforme a las recomendaciones del fabricante.
8. Programar el instrumento Rotor-Gene Q con el programa de termociclado según se indica en la tabla 5.

Tabla 5. Perfil de temperatura.

Modo de análisis	Cuantificación
Espera 1	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 s
Ciclo	50 veces 95 °C durante 5 s 60 °C durante 30 s con adquisición de fluorescencia FAM en el canal Green: Single
Espera 2	Temperatura: 36 °C Tiempo: 1 min

9. Hacer clic en “Gain Optimisation” (optimización de ganancia) en el cuadro de diálogo “New Run Wizard” (asistente para series nuevas) para abrir el cuadro de diálogo “Auto-Gain Optimisation Setup” (configuración de la optimización de ganancia automática). Configurar el rango para el canal Green de “5 FI” para “Min Reading” (lectura mínima) a “10 FI” para “Max Reading” (lectura máxima) y el rango de ganancia aceptable entre -10 y 10.
10. Marcar la casilla “Perform Optimisation Before 1st Acquisition” (ejecutar la optimización antes de la primera adquisición) y cerrar el cuadro de diálogo “Auto-Gain Optimisation Setup” (configuración de la optimización de ganancia automática).
11. Iniciar el programa de termociclado.
Seleccionar “Slope Correct” (corrección de pendiente) para el análisis.

Protocolo: qPCR en los instrumentos Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS y LightCycler 480

Utilizando un instrumento de qPCR con placas de 96 pocillos, recomendamos realizar todas las mediciones por duplicado, según se indica en la tabla 6. El kit está diseñado para analizar 8 muestras de ADNc diferentes en el mismo experimento 3 veces.

Tabla 6. Número de reacciones empleando un equipo de qPCR con placa de 96 pocillos.

Muestras	Reacciones
Con la mezcla de primers y sonda para ABL (PPC-ABL) (32 reacciones)	
8 muestras de ADNc	8 x 2 reacciones
1 control positivo alto de ADNc	2 reacciones
1 calibrador IS-MMR para ADNc	2 reacciones
Patrones de plásmido simple	2 x 4 reacciones (SP3, SP4, SP5 y SP6, cada uno analizado por duplicado)
Control negativo de RT	2 reacciones
Control de agua	2 reacciones
Con la mezcla de primers y sonda para BCR-ABL Mbc (PPC-Mbc) (32 reacciones)	
8 muestras de ADNc	8 x 2 reacciones
1 control positivo alto de ADNc	2 reacciones
1 calibrador IS-MMR para ADNc	2 reacciones
Patrones de plásmido simple	2 x 5 reacciones (SP1, SP2, SP3, SP5 y SP6, cada uno analizado por duplicado)
Control de agua	2 reacciones

Procesamiento de las muestras en los instrumentos Applied Biosystems, ABI PRISM y LightCycler 480

Recomendamos analizar como mínimo 8 muestras de ADNc en el mismo experimento para optimizar el uso de los patrones y de las mezclas de primers y sonda. El esquema de la placa representado en la figura 5 muestra un ejemplo de este experimento.

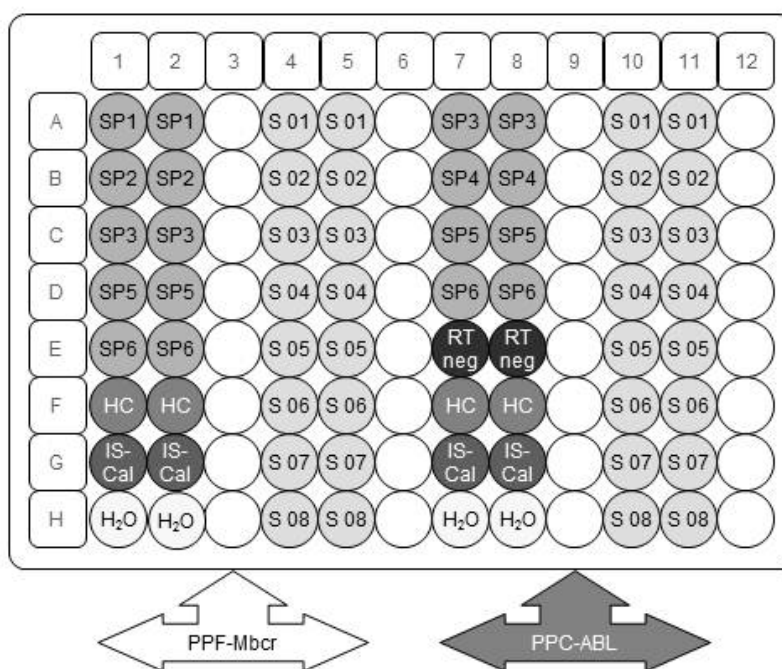


Figura 5. Disposición recomendada de la placa para un experimento con el kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR. SP1-SP6: patrones de BCR-ABL Mbc y ABL; HC: control positivo alto de ADNc; IS-Cal: calibrador IS-MMR; RTneg: control negativo de RT; S: muestra de ADNc; H₂O: control de agua.

qPCR en los instrumentos Applied Biosystems, ABI PRISM o LightCycler 480

Nota: Realice todos los pasos en hielo.

Procedimiento

1. Descongelar todos los componentes necesarios y colocarlos en hielo.
2. Mezclar en vórtex los tubos de patrones, ROX, PPF-Mbc y PPC-ABL, y centrifugar brevemente (durante aproximadamente 10 segundos a 10.000 rpm, para recoger el líquido en el fondo del tubo).
3. Preparar la siguiente mezcla de qPCR según el número de muestras que vayan a procesarse. Si se utiliza un equipo de qPCR con placa

de 96 pocillos, recomendamos realizar todas las mediciones por duplicado.

Todas las concentraciones se refieren al volumen final de la reacción.

En la tabla 7 se describe el esquema de pipeteo para la preparación de una mezcla de reactivos para los instrumentos Applied Biosystems y ABI PRISM, calculada para lograr un volumen de reacción final de 25 μ l. En la tabla 8 se describe el esquema de pipeteo para la preparación de una mezcla de reactivos para el instrumento LightCycler 480, calculada para lograr un volumen de reacción final de 25 μ l. Puede prepararse una premezcla según el número de reacciones utilizando la misma mezcla de primers y sonda (PPC-ABL o PPF-Mbcr). Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

Tabla 7. Preparación de la mezcla de qPCR para los instrumentos Applied Biosystems y ABI PRISM.

Componente	1 reacción (μ l)	BCR-ABL		Concentración final
		ABL: 32 + 1 reacciones (μ l)	Mbcr: 32 + 1 reacciones (μ l)	
Premix Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Mezcla de primers y sonda, 25x	1	33	33	1x
Colorante ROX I, 50x (ABI PRISM 7900HT) o colorante ROX II, 50x (Applied Biosystems 7500)	0,5	16,5	16,5	1x
Agua libre de nucleasas apta para PCR	6	198	198	–
Muestra (se añadirá en el paso 5)	5	5 para cada una	5 para cada una	–
Volumen total	25	25 para cada una	25 para cada una	–

Tabla 8. Preparación de la mezcla de qPCR para el instrumento LightCycler 480.

Componente	1 reacción (μl)	ABL: 32 + 1 reacciones (μl)	BCR-ABL Mbc: 32 + 1 reacciones (μl)	Concentración final
Premix Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Mezcla de primers y sonda, 25x	1	33	33	1x
Agua libre de nucleasas apta para PCR	6,5	214,5	214,5	–
Muestra (se añadirá en el paso 5)	5	5 para cada una	5 para cada una	–
Volumen total	25	25 para cada una	25 para cada una	–

4. Poner 20 μ l de la premezcla de qPCR por pocillo.
5. En un área diferente del laboratorio con un equipo dedicado exclusivamente, agregar 5 μ l del producto de RT (ADNc, equivalente a 200 ng de ARN) obtenido en el proceso de transcripción inversa (véase “Protocolo: transcripción inversa con SuperScript III Reverse Transcriptase”, página 15) en el pocillo correspondiente (volumen total, 25 μ l).
6. Mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo.
7. Cerrar la placa y centrifugar brevemente (300 x g durante aproximadamente 10 s).
8. Colocar la placa en el termociclador conforme a las recomendaciones del fabricante. Programar el termociclador con el programa de termociclado según se indica en la tabla 9 para los instrumentos Applied Biosystems y ABI PRISM, o según se indica en la tabla 10 para el instrumento LightCycler 480.

Tabla 9. Perfil de temperatura para los instrumentos Applied Biosystems y ABI PRISM.

Modo de análisis	Curva patrón – Cuantificación absoluta
Espera 1	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 s
Ciclo	50 veces 95 °C durante 5 s 60°C durante 30 s, con adquisición de fluorescencia FAM: Single; extintor de fluorescencia: TAMRA
Espera 2	Temperatura: 36 °C Tiempo: 1 min

Tabla 10. Perfil de temperatura para el instrumento LightCycler 480.

Modo de análisis	Cuantificación absoluta (“Abs Quant”)
Detection formats (formatos de detección)	Seleccionar “Simple Probe” (sonda simple) en la ventana Detection formats
Espera 1	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 s
Ciclo	50 veces 95 °C durante 5 s 60°C durante 30 s con adquisición de fluorescencia FAM correspondiente a (483-533 nm) para LC versión 01 y (465-510 nm) para LC versión 02.
Espera 2	Temperatura: 36 °C Tiempo: 1 min

- 9. Para los instrumentos Applied Biosystems 7500 y ABI PRISM 7900HT SDS, seguir el paso 9a. Para el instrumento LightCycler 480, seguir el paso 9b.**
- 9a. Applied Biosystems y ABI PRISM: recomendamos fijar el umbral en 0,1 en el paso de análisis en el instrumento. Iniciar el programa de ciclado según se indica en la tabla 9.**
- 9b. Instrumento LightCycler 480: recomendamos el modo "Fit point analysis" (análisis del punto de ajuste) con fondo en 2,0 y umbral en 2,0. Iniciar el programa de termociclado según se indica en la tabla 10.**

Protocolo: qPCR en los instrumentos LightCycler 1.2, 1.5 y 2.0

Utilizando instrumentos para capilares, recomendamos realizar las mediciones de las muestras por duplicado y de los controles una sola vez, según se indica en la tabla 11. El kit está diseñado para analizar 4 muestras de ADNc diferentes en el mismo experimento 6 veces.

Tabla 11. Número de reacciones para los instrumentos LightCycler 1.2, 1.5 y 2.0.

Muestras	Reacciones
Con la mezcla de primers y sonda para ABL (PPC-ABL) (16 reacciones)	
4 muestras de ADNc	4 x 2 reacciones
1 control positivo alto de ADNc	1 reacción
1 calibrador IS-MMR para ADNc	1 reacción
Patrones de plásmido simple	1 x 4 reacciones (SP3, SP4, SP5 y SP6)
Control negativo de RT	1 reacción
Control de agua	1 reacción
Con la mezcla de primers y sonda para BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc) (16 reacciones)	
4 muestras de ADNc	4 x 2 reacciones
1 control positivo alto de ADNc	1 reacción
1 calibrador IS-MMR para ADNc	1 reacción
Patrones de plásmido simple	1 x 5 reacciones (SP1, SP2, SP3, SP5 y SP6)
Control de agua	1 reacción

Procesamiento de las muestras en los instrumentos LightCycler 1.2, 1.5 y 2.0

Recomendamos analizar como mínimo 4 muestras de ADNc en el mismo experimento para optimizar el uso de los patrones y de las mezclas de primers

y sonda. El esquema de capilares representado en la figura 6 muestra un ejemplo de un experimento.

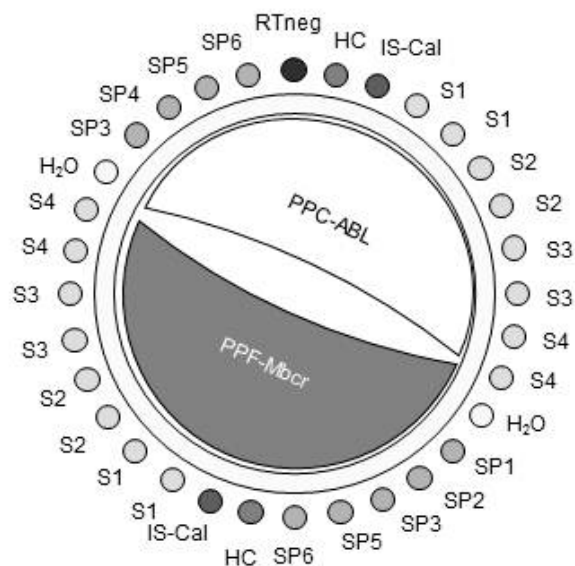


Figura 6. Disposición recomendada del rotor para cada experimento con el kit ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR. SP1-SP6: patrones de BCR-ABL Mbcr y ABL; **HC:** control positivo alto de ADNc; **IS-Cal:** calibrador IS-MMR; **RTneg:** control negativo de RT; **S:** muestra de ADNc; **H₂O:** control de agua.

qPCR en los instrumentos LightCycler 1.2, 1.5 y 2.0

Nota: Realice todos los pasos en hielo.

Procedimiento

1. **Descongelar todos los componentes necesarios y colocarlos en hielo.**
2. **Mezclar en vórtex los tubos de patrones, PPF-Mbcr y PPC-ABL, y centrifugar brevemente (durante aproximadamente 10 s a 10.000 rpm, para recoger el líquido en el fondo del tubo).**
3. **Preparar la siguiente mezcla de qPCR según el número de muestras que vayan a procesarse.**

Todas las concentraciones se refieren al volumen final de la reacción.

En la tabla 12 se describe el esquema de pipeteo para la preparación de una mezcla de reactivos, calculada para lograr un volumen de reacción final de 20 μ l. Puede prepararse una premezcla según el número de reacciones utilizando la misma mezcla de primers y sonda (PPC-ABL o PPF-Mbcr). Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

Tabla 12. Preparación de la mezcla de qPCR para los instrumentos LightCycler 1.2, 1.5 y 2.0.

Componente	1 reacción (μl)	ABL: 16 + 1 reacciones (μl)	BCR-ABL Mbc: 16 + 1 reacciones (μl)	Concentración final
Premix Ex Taq, 2x	10	170	170	1x
Mezcla de primers y sonda, 25x	0,8	13,6	13,6	1x
Agua libre de nucleasas apta para PCR	4,2	71,4	71,4	–
Muestra (se añadirá en el paso 5)	5	5 para cada una	5 para cada una	–
Volumen total	20	20 para cada una	20 para cada una	–

4. Poner 15 μ l de la premezcla de qPCR por capilar.
5. En un área diferente del laboratorio con un equipo dedicado exclusivamente, agregar 5 μ l del producto de RT (ADNc, equivalente a 200 ng de ARN) obtenido en el proceso de transcripción inversa (véase "Protocolo: transcripción inversa con SuperScript III Reverse Transcriptase", página 15) en el capilar correspondiente (volumen total, 20 μ l).
6. Mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo.
7. Colocar los capilares en los adaptadores suministrados con el aparato y centrifugar brevemente (700 x g, durante aproximadamente 10 s).
8. Colocar los capilares en el termociclador conforme a las recomendaciones del fabricante.
9. Programar el instrumento LightCycler 1.2, 1.5 o 2.0 con el programa de termociclado según se indica en la tabla 13.

Tabla 13. Perfil de temperatura.

Modo de análisis	Cuantificación
Espera 1	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 s Rampa: 20
Ciclo	50 veces 95 °C durante 5 s; rampa: 20 60 °C durante 30 s; rampa: 20; con adquisición de fluorescencia FAM: Single
Espera 2	Temperatura: 36 °C Tiempo: 1 min Rampa: 20

10. Para los instrumentos LightCycler 1.2 y 1.5, seguir el paso 10a. Para el instrumento LightCycler 2.0, seguir el paso 10b.

10a. LightCycler 1.2 y 1.5: se recomienda el modo F1/F2 y "2nd derivative analysis" (segundo análisis derivativo). Iniciar el programa de termociclado según se indica en la tabla 13.

10b. LightCycler 2.0: se recomienda usar el análisis automático (F''max) en la versión 4.0 del software del instrumento LightCycler 2.0 para obtener resultados reproducibles. Iniciar el programa de termociclado según se indica en la tabla 13.

Interpretación de los resultados

Principio de análisis de los datos

Cuando se utiliza la tecnología TaqMan®, el número de ciclos de PCR necesario para detectar una señal por encima del umbral se denomina ciclo de umbral (C_T) y es directamente proporcional a la cantidad de diana presente al principio de la reacción.

Utilizando patrones con un número conocido de moléculas, es posible establecer una curva patrón y determinar la cantidad precisa de diana presente en la muestra de ensayo. Las curvas patrón de *ipsogen* están basadas en plásmidos. Para garantizar la obtención de curvas patrón precisas, utilizamos 4 diluciones patrón para ABL y 5 diluciones patrón para Mbc. El kit incluye también un calibrador IS-MMR que permite convertir los resultados a la escala internacional. Las figuras 7 y 8 presentan ejemplos de curvas de amplificación TaqMan obtenidas para los patrones, para el calibrador IS-MMR y para el control positivo alto de ARN con el kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR.

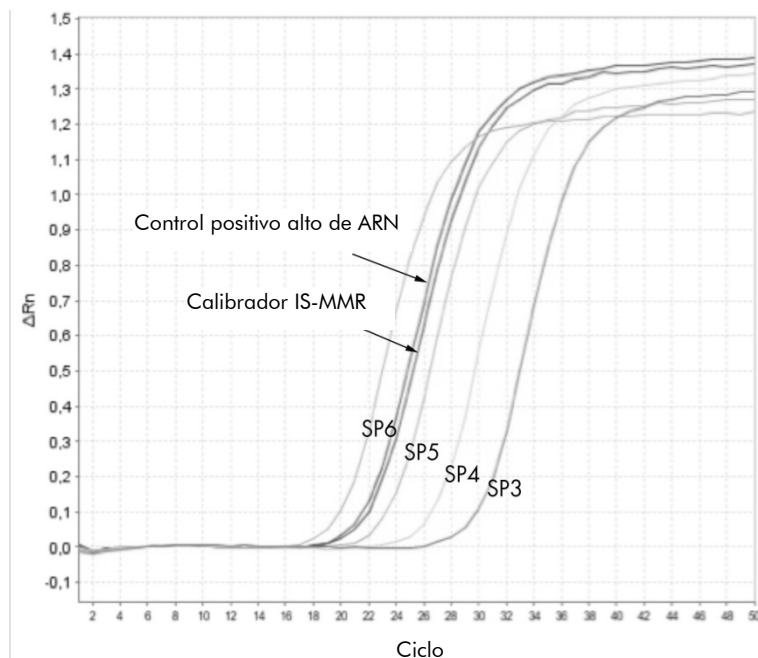


Figura 7. Detección de ABL con los patrones SP3, SP4, SP5 y SP6. 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 copias/ $5 \mu\text{l}$.

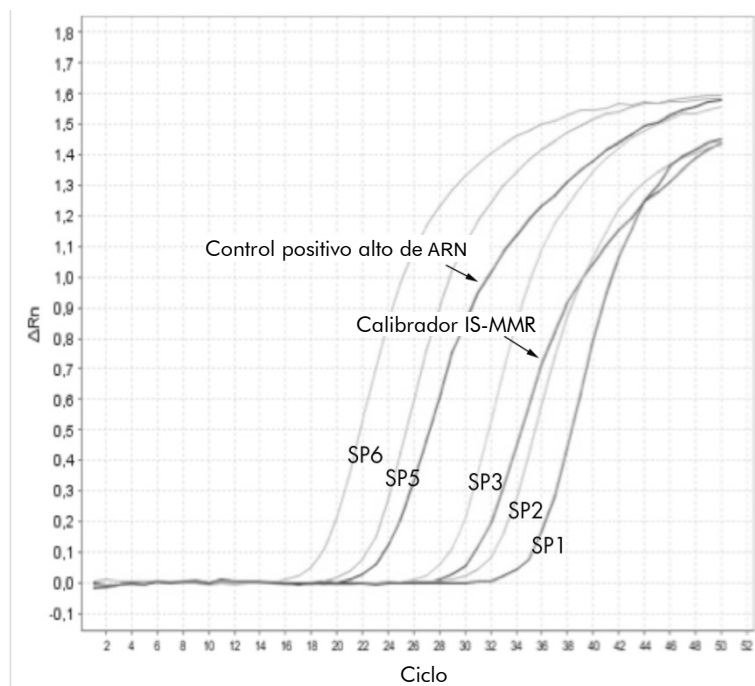


Figura 8. Detección de BCR-ABL Mbc con los patrones SP1, SP2, SP3, SP5 y SP6. 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 copias/ $5 \mu\text{l}$.

Curvas patrón y criterios de calidad aplicables a los datos brutos

Reproducibilidad entre duplicados

La variación en los valores de C_T entre los duplicados debe ser < 2 , que corresponde a un cambio de cuatro veces en los valores del número de copias.

La variación en los valores de C_T entre los duplicados suele ser $< 1,5$ si el valor medio de C_T de los duplicados es < 36 (7).

Nota: Cada usuario debe determinar su propia reproducibilidad en su laboratorio.

Curvas patrón

Los datos brutos pueden pegarse en un archivo de Excel® para su análisis.

Para cada gen (ABL y BCR-ABL), los valores brutos de C_T obtenidos con las diluciones patrón del plásmido se representan en una gráfica según el logaritmo del número de copias (3, 4, 5 y 6 para SP3, SP4, SP5 y SP6; 1, 2, 3, 5 y 6 para SP1, SP2, SP3, SP5 y SP6). La figura 9 muestra un ejemplo de una curva patrón teórica de ABL calculada con 4 diluciones patrón. La figura 10 muestra un ejemplo de una curva patrón teórica de BCR-ABL calculada con 5 diluciones patrón.

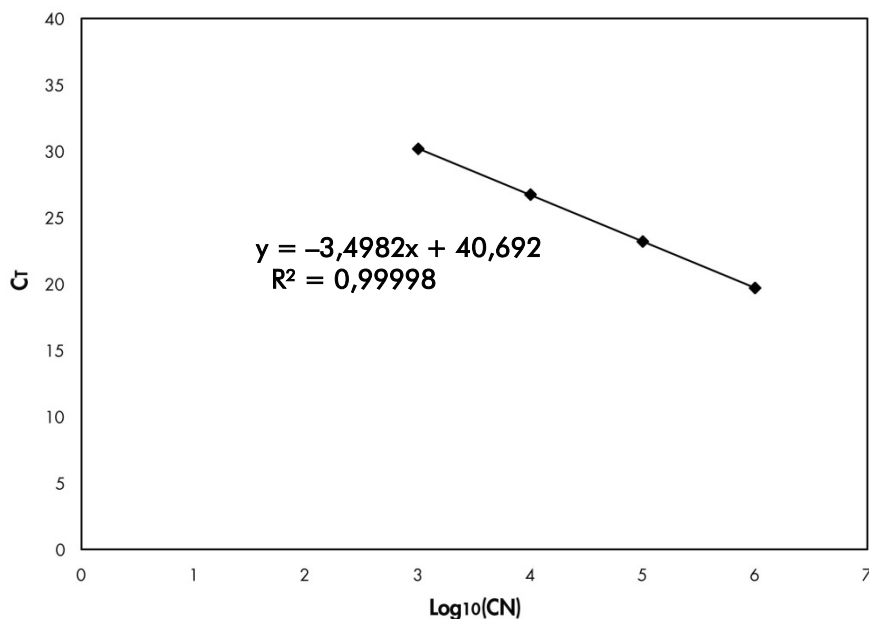


Figura 9. Curva patrón teórica para ABL calculada a partir de 4 diluciones patrón. Se calcula una curva de regresión lineal ($y = ax + b$), en la que "a" es la pendiente de la línea y "b" es la ordenada en el origen, que es la coordenada y del punto en el que la línea cruza el eje de ordenadas (eje y). Su ecuación y su coeficiente de determinación (R^2) se imprimen en la gráfica.

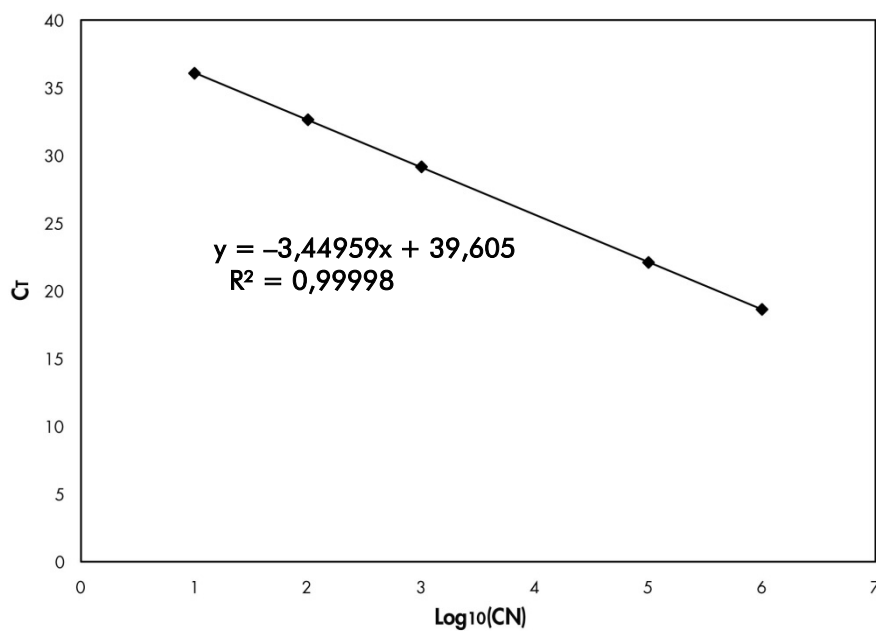


Figura 10. Curva patrón teórica para BCR-ABL calculada a partir de 5 diluciones patrón. Se calcula una curva de regresión lineal ($y = ax + b$), en la que "a" es la pendiente de la línea y "b" es la ordenada en el origen, que es la coordenada y del punto en el que la línea cruza el eje de ordenadas (eje y). Su ecuación y su coeficiente de determinación (R^2) se imprimen en la gráfica.

Como los patrones son diluciones de diez veces, la pendiente teórica de la curva es $-3,3$. Una pendiente comprendida entre $-3,0$ y $-3,9$ es aceptable

siempre que R^2 sea $> 0,95$ (7). Sin embargo, es deseable un valor de $R^2 > 0,98$ para que los resultados sean precisos (3).

Nota: La dilución patrón SP1 (plásmido BCR-ABL, 10 copias) debe detectarse e incluirse en la curva patrón de BCR-ABL.

Control de calidad de todos los valores de ABL

La mala calidad del ARN o la aparición de problemas durante los pasos de la qPCR dan lugar a números bajos de copias del gen ABL (ABL_{CN}). Se consigue una sensibilidad óptima con muestras que den resultados de $ABL_{CN} \geq 10.000$ copias. Este criterio sobre el valor ABL_{CN} también es aplicable al control positivo alto de ARN y al calibrador IS-MMR.

Control negativo de RT y control de agua

Los controles sin molde (NTC, *no template controls*) para el paso de PCR (control de agua) y para el paso de transcripción inversa (control negativo de RT) deben dar un valor de CN de cero para ABL y BCR-ABL M_{bcr}. Un resultado positivo para estos NTC indica contaminación cruzada durante la transcripción inversa y/o la qPCR.

Número de copias normalizado (NCN)

La ecuación de la curva patrón de ABL debe emplearse para transformar los valores brutos de C_T (obtenidos con PPM-ABL) de las muestras desconocidas en números de copias del gen ABL (ABL_{CN}).

La ecuación de la curva patrón de BCR-ABL debe emplearse para transformar los valores brutos de C_T (obtenidos con PPM-M_{bcr}) de las muestras desconocidas en números de copias del gen BCR-ABL ($BCR-ABL_{M_{bcr}_{CN}}$).

El cociente de estos valores de CN constituye el número de copias normalizado (NCN):

$$NCN = \frac{BCR-ABL_{M_{bcr}_{CN}}}{ABL_{CN}} \times 100$$

Calcule el resultado de NCN para el control positivo alto de ARN (NCN_{HC}), el calibrador IS--MMR (NCN_{cal}) y cada muestra ($NCN_{muestra}$).

Control positivo alto de ARN y calibrador IS-MMR

Estos controles permiten el seguimiento de los pasos de transcripción inversa y amplificación de ABL y de BCR-ABL M_{bcr} durante la cuantificación de los transcritos.

Control de calidad del resultado de NCN_{cal}

Nota: El resultado de NCN obtenido para el calibrador IS-MMR, analizado con el kit *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR en combinación con reactivos e instrumentos validados (véase “Materiales suministrados”, página 10, y “Materiales necesarios pero no suministrados”, página 11), debe estar dentro del intervalo 0,05-0,3. De lo contrario, los valores de NCN no pueden convertirse a la escala internacional. Además, deberá rechazarse todo el experimento si no se detecta el control positivo alto de ARN.

Conversión a la escala internacional (IS) y notificación del resultado de MMR

Nota: Antes de la interpretación, debe consultarse el valor indicador la etiqueta del tubo del calibrador IS-MMR o en el certificado de análisis proporcionado con el kit.

Utilice el resultado experimental de NCN del calibrador IS-MMR (NCN_{cal}) y su valor asignado (valor IS-Cal) indicado en el certificado de análisis para calcular el número de copias normalizado en la escala internacional ($IS-NCN_{muestra}$).

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

Determine el estado de MMR de cada muestra según los criterios indicados a continuación.

- **$IS-NCN_{muestra} \leq 0,05$** : respuesta molecular mayor (MMR, mayor molecular response)
- **$0,05 < IS-NCN_{muestra} < 0,15$** : zona gris (GZ, gray zone) alrededor del valor divisorio de MMR, resultado no concluyente
- **$IS-NCN_{muestra} \geq 0,15$** : sin respuesta molecular mayor

El resultado de $IS-NCN_{HC}$ (NCN en la escala internacional para el control positivo alto de ARN) debería no dar una respuesta molecular mayor.

En la figura 11 se presenta un ejemplo de seguimiento del paciente por medio de los resultados de NCN y $IS-NCN$.

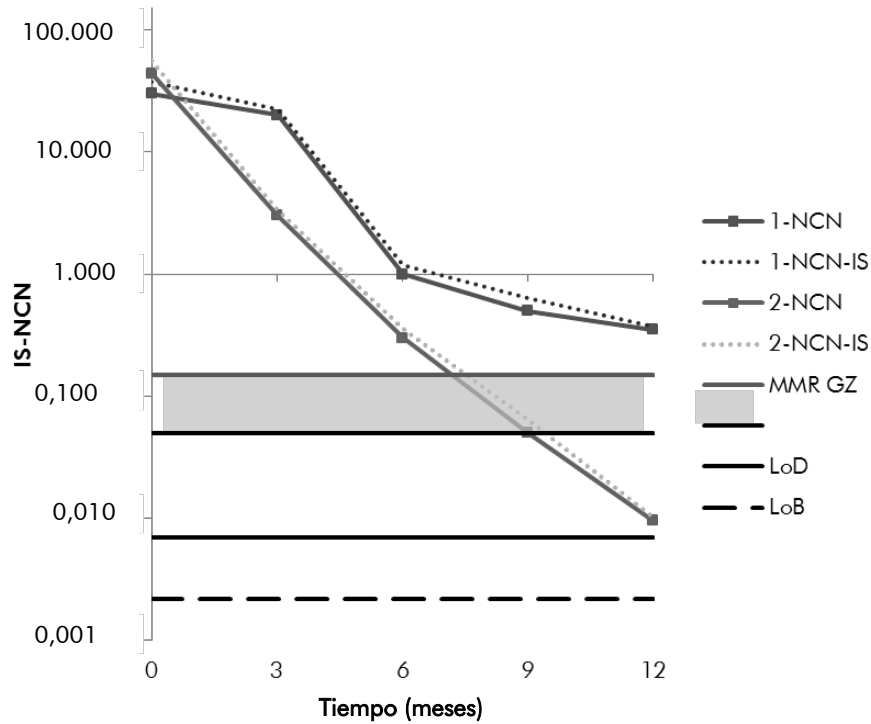


Figura 11. Curvas de seguimiento del estado de MMR del paciente con el kit ipsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR. **NCN:** número de copias normalizado; **NCN-IS:** número de copias normalizado convertido a la escala internacional; **MMR GZ:** zona gris (GZ) de MMR, resultado no concluyente; **LoD:** límite de detección (*limit of detection*); **LoB:** nivel de fondo (*limit of blank*).

Resumen de los criterios de calidad

En la tabla 14 se resumen los diversos criterios de calidad y los valores o resultados asociados.

Tabla 14. Resumen de los criterios de calidad.

Criterios	Valores/resultados aceptables
Variaciones en los valores de C_T entre duplicados	$\leq 2 C_T$ si el valor medio de C_T es > 36 $\leq 1,5 C_T$ si el valor medio de C_T es ≤ 36
Pendiente de las curvas patrón	Entre $-3,0$ y $-3,9$
R^2 de las curvas patrón	Al menos $> 0,95$, mejor si $> 0,98$
Dilución patrón SP1 (10 copias de plásmido con BCR-ABL)	Debe detectarse y estar incluido en la curva patrón
Control de calidad del valor ABL_{CN} para las muestras del paciente, el control positivo alto de ARN y el calibrador IS-MMR	$ABL_{CN} > 10.000$ copias de ABL para alcanzar la sensibilidad óptima
Controles para PCR (control de agua) y para transcripción inversa (control negativo de RT)	Para cada $ABL_{CN} = 0$ y $Mbcr_{CN} = 0$
NCN obtenido para el calibrador IS-MMR (NCN_{cal})	Debe estar dentro del intervalo $0,05-0,3$
Control positivo alto de ARN	Debe detectarse
NCN obtenido para el control positivo alto de ARN convertido a la escala internacional ($IS-NCN_{HC}$)	Estado: sin respuesta molecular mayor

Guía de resolución de problemas

Si desea más información, consulte la página de preguntas frecuentes (Frequently Asked Questions, FAQ) de nuestro Centro de Soporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del Servicio Técnico de QIAGEN estarán siempre encantados de responder a cualquier pregunta que pueda usted tener sobre la información y el protocolo de este manual, así como sobre las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de

biología molecular (encontrará la información de contacto en el apartado “Información de contacto”, página 46).

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto. Los certificados de los análisis pueden solicitarse en www.qiagen.com/support/.

Limitaciones

Antes de utilizar este dispositivo, los usuarios deberán recibir la formación pertinente y estar familiarizados con esta tecnología.

Todo resultado diagnóstico que se genere debe interpretarse en combinación con otros hallazgos clínicos o de laboratorio. Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema para cualquier procedimiento utilizado en su laboratorio que no haya sido avalado por los estudios de rendimiento de QIAGEN.

Debe prestarse atención a las fechas de caducidad impresas en la caja y en las etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados.

Nota: El kit se ha diseñado con arreglo a los estudios del programa “Europe Against Cancer” (EAC) (8, 9) y cumple las recomendaciones internacionales actualizadas. El kit contiene un calibrador IS-MMR, normalizado con respecto a la escala internacional, que permite convertir los resultados de NCN a la escala internacional y notificar el resultado del estado de MMR (respuesta molecular mayor).

Cada lote del calibrador IS-MMR tiene un valor asignado derivado directamente de una calibración frente al material de referencia primario certificado de la OMS/NIBSC (International Genetic Reference Panel for the quantitation of BCR-ABL translocation by RQ-PCR [1st I.S.], ref. 09/138).

Con cada kit se proporciona un certificado de análisis que indica el valor asignado del calibrador IS-MMR.

El kit debe utilizarse siguiendo las instrucciones recogidas en este manual, junto con reactivos e instrumentos validados (véase “Materiales necesarios pero no suministrados”, página 11). Cualquier uso no autorizado de este producto o modificación de los componentes eximirá a QIAGEN de cualquier responsabilidad.

Características del rendimiento

Nota: Las características de rendimiento se establecieron utilizando el instrumento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System en combinación con el kit *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR y otros reactivos validados (véase “Materiales necesarios pero no suministrados”, página 11).

Límite de blanco y límite de detección

El límite de blanco (LoB) y el límite de detección (LoD) se determinaron con arreglo a la directriz EP17-A del CLSI/NCCLS.

El nivel de fondo (LoB) se determinó en muestras negativas de donantes sanos (11 muestras, 69 mediciones) y fue igual a 0,0022 NCN de BCR-ABL MbcR.

El límite de detección (LoD o sensibilidad analítica) se determinó en muestras con valores positivos bajos conocidos ($n = 8$, 74 mediciones) y fue igual a 0,0069 NCN de BCR-ABL MbcR.

- **NCN \leq LoB:** BCR-ABL MbcR no detectado
- **LoB < NCN < LoD:** BCR-ABL MbcR detectado pero no cuantificado
- **NCN \geq LoD:** BCR-ABL MbcR cuantificado

Linealidad

La linealidad se determinó con arreglo a la directriz EP6-A del CLSI/NCCLS.

El estudio se llevó a cabo con mezclas de ARN positivo y negativo extraído de líneas celulares. Se analizaron once niveles diferentes por triplicado. Los resultados obtenidos con estas muestras indican que el ensayo *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR es lineal en un intervalo de 0,003 a 65 NCN de BCR-ABL MbcR.

Cantidad de muestra

Para el estudio se seleccionaron cinco ARN diferentes con diversos niveles de NCN de BCR-ABL MbcR. Se analizaron diferentes cantidades de ARN y ADNc para evaluar la influencia de la cantidad de muestra en los resultados de NCN. Los resultados mostraron que la variación de la cantidad de muestra de ARN tuvo una influencia limitada en los resultados de NCN, mientras que la cantidad de muestra de ADNc fue un factor más sensible según se utilizara más o menos material. Como consecuencia, se recomienda una cantidad de muestra de 1 μ g de ARN y de 5 μ l de ADNc para realizar la prueba.

Precisión

La precisión se determinó con arreglo a la directriz EP5-A2 del CLSI/NCCLS.

El estudio de precisión se realizó con 13 muestras diferentes analizadas 42 veces por duplicado ($n = 84$). Estas muestras eran representativas del nivel

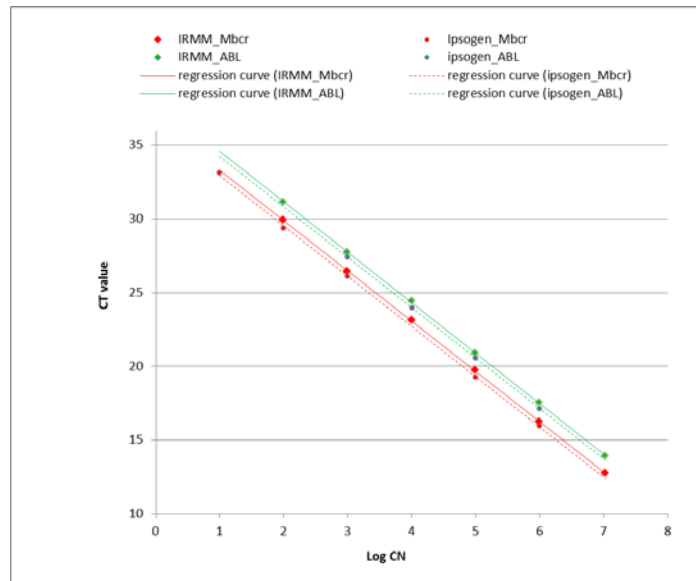
diferente de expresión de BCR-ABL MbcR en muestras de pacientes en torno y por encima del valor de MMR. El coeficiente de variación global en torno al valor de MMR fue igual al 25%.

Estudio de concordancia: comparación entre el patrón de plásmido simple ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM) y el patrón de plásmido simple *ipsogen* (QIAGEN).

El Molecular Monitoring Steering Group de ELN/EUTOS ofrece las definiciones funcionales más recientes de la respuesta molecular de BCR-ABL1 MbcR para LMC, que recomienda el uso del patrón de plásmido ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM, Bélgica): Cross, N.C., et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia (2015) *Leukemia*. **29**, 999.

Para cumplir esta recomendación, QIAGEN realizó un estudio de concordancia para comparar el patrón de plásmido simple de varias dianas *ipsogen*, utilizado en el kit *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR (24) CE (n.º de referencia 670723), con el patrón de plásmido ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM).

La comparación se basó en la proporción del número de copias normalizado (NCN) de BCR-ABL1 MbcR/ABL1, evaluada mediante el uso de una de las dos diluciones patrón (*ipsogen* o ERM-AD623 BCR-ABL1), en las muestras de control incluidas en los kits *ipsogen* y en el material de referencia certificado del NIBSC: White, H.E., et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.

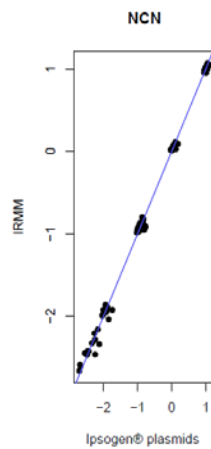


curva de regresión

Valor de C_T

CN log

Figura 12. Las curvas de los patrones de plásmido *ipsogen* y ERM-AD623 BCR-ABL1 están alineadas.



NCN

IRMM

Plásmidos *ipsogen*®

Kit *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR.

Figura 13. Comparación de los valores NCN de ERM-AD623 BCR-ABL1 con los de *ipsogen*.

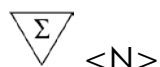
El estudio de QIAGEN concluye que no existe ninguna diferencia estadística: el patrón de plásmido simple ERM-AD623 BCR-ABL1 y el patrón de plásmido simple *ipsogen* proporcionan resultados equivalentes.

Referencias bibliográficas

1. Baccarani, M. et al. (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **108**, 1809.
2. Baccarani, M. et al. (2009) Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6041.
3. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.
4. Branford, S. et al. (2008) Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* **112**, 3330.
5. Hughes, T. et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* **108**, 28.
6. White, H.E. et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.
7. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and van Dongen, J.J. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
8. Gabert, J. et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* **17**, 2318.
9. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.

Símbolos

Los siguientes símbolos pueden aparecer en el envase y en el etiquetado:



Contiene reactivos suficientes para <N> reacciones



Fecha de caducidad



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro



Número de referencia



Número de lote



Número de material



Número mundial de artículo comercial



Limitación de temperatura



Fabricante



Consultar instrucciones de uso

Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, consulte nuestro Centro de Soporte Técnico en www.qiagen.com/Support llame al número de teléfono 00800-22-44-6000 o póngase en contacto con uno de los departamentos de Servicio Técnico de QIAGEN o distribuidores locales (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de referencia
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit (24)	Para 24 reacciones: patrones de plásmido simple de MbcR y ABL, control positivo alto de ARN, calibrador IS-MMR, mezcla de primers y sonda para ABL, mezcla de primers y sonda para el gen de fusión BCR-ABL MbcR	670723
Rotor-Gene Q MDx: para análisis de PCR en tiempo real validado para diagnóstico in vitro en aplicaciones clínicas		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, no se incluye la instalación y la formación	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002033
Kit <i>ipsogen</i> RT: para transcripción inversa		
<i>ipsogen</i> RT Kit	Transcriptasa inversa, primer aleatorio, DTT, dNTP, inhibidor de ARNasa, tampón para RT	679923
Kits RNeasy: para purificación de ARN total		
RNeasy Midi Kit (50)	Para 50 preparaciones de ARN: 50 columnas RNeasy Midi Spin, tubos de recogida (15 ml), reactivos libres de ARNasa y tampones	75144

Si desea obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía de usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías de usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en **www.qiagen.com** o pueden solicitarse al Servicio Técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

Este producto está indicado para diagnóstico in vitro. Los productos *ipsogen* no deben ser revendidos, modificados para reventa ni utilizados para fabricar otros productos comerciales sin la autorización por escrito de QIAGEN.

La información del presente documento puede ser modificada sin previo aviso. QIAGEN no asume ninguna responsabilidad por los errores que puedan encontrarse en este documento. Este documento se considera íntegro y exacto en el momento de su publicación. QIAGEN declina toda responsabilidad por daños fortuitos, especiales, múltiples o derivados del uso de este documento.

Se garantiza que los productos *ipsogen* cumplen las especificaciones indicadas. La única obligación de QIAGEN y la única compensación al cliente se limitan a la sustitución de los productos sin cargo en el caso de que estos no funcionen de acuerdo a la garantía.

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

Acuerdo de licencia limitada

La utilización de este producto implica la aceptación de los siguientes términos por parte de cualquier comprador o usuario del kit *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR:

1. El kit *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR puede utilizarse únicamente de acuerdo con las instrucciones recogidas en el *Manual del kit ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR* y utilizando exclusivamente los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes contenidos en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en el *Manual del kit ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR* y en otros protocolos disponibles en **www.qiagen.com**.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este kit ni su(s) uso(s) no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no pueden ser reutilizados, reacondicionados ni revendidos.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones que hayan sido prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada, y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de garantía limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite **www.qiagen.com**.

HB-1362-003 © 2013–2016 QIAGEN, reservados todos los derechos.

www.qiagen.com

