

Manuel du kit *ipsogen*[®] BCR-ABL1 Mbc



Version 1

IVD

Diagnostics *in vitro* quantitatifs

À utiliser sur les appareils Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®],
LightCycler[®] et SmartCycler[®]



REF

670123



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALLEMAGNE

R2

MAT

107250FR



QIAGEN : Sample and Assay Technologies

QIAGEN est le premier fournisseur de technologies novatrices d'échantillons et d'analyses, permettant d'isoler et de détecter le contenu de n'importe quel échantillon biologique. Nos produits et services ultramodernes de grande qualité garantissent un succès total, de l'échantillon jusqu'au résultat.

QIAGEN fixe les normes en matière de :

- purification d'ADN, d'ARN et de protéines ;
- analyse d'acides nucléiques et de protéines ;
- recherche de microARN et interférence ARN ;
- automatisation des technologies d'échantillons et d'analyses.

Notre mission est de permettre à notre clientèle de réussir et d'accomplir des progrès décisifs. Pour plus d'informations, visiter www.qiagen.com.

Contenu

Utilisation prévue	5
Résumé et explication	5
Surveillance de la maladie	5
Principe de la procédure	9
Matériel fourni	11
Contenu du kit	11
Matériel nécessaire mais non fourni	12
Avertissements et précautions	13
Précautions générales	14
Conservation et manipulation des réactifs	14
Procédure	16
Préparation de l'échantillon d'ARN	16
Protocoles	
■ EAC de transcription inverse standardisé et recommandé	16
■ Réalisation d'une qPCR sur un appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ou Rotor-Gene Q 5plex HRM avec rotor de 72 tubes	19
■ Réalisation d'une qPCR sur un appareil ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900HT SDS ou LightCycler 480	23
■ Réalisation d'une qPCR sur un appareil LightCycler 1.2 ou 2.0	28
■ Réalisation d'une qPCR sur un appareil SmartCycler	32
Interprétation des résultats	36
Principe d'analyse des données	36
Résultats	37
Guide de résolution des problèmes	40
Contrôle qualité	43
Limites	43
Caractéristiques de performance	44
Études non cliniques	44
Études cliniques	46
Bibliographie	49
Symboles	51

Coordonnées	51
Pour commander	52

Utilisation prévue

Le kit *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR est conçu pour la quantification des transcrits BCR-ABL p210 b2a2 ou b3a2 dans des échantillons de moelle osseuse ou de sang périphérique prélevés chez des patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) ou de leucémie myéloïde chronique (LMC) chez lesquels un événement lié à l'expression du gène de fusion (FG) BCR-ABL MbcR a été diagnostiqué. Ce test permet d'évaluer l'importance de la réponse moléculaire ; les résultats peuvent contribuer au suivi de la maladie résiduelle imperceptible.

Résumé et explication

La LMC appartient à la famille des néoplasmes myéloprolifératifs et se caractérise dans plus de 90 % des cas par la présence du chromosome Philadelphie (Ph CHR5).

Ce chromosome est le produit d'une translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 t(9;22), la région du point de cassure BCR (*breakpoint cluster region*) étant située sur le chromosome 22 et l'oncogène c-ABL découlant du chromosome 9. Le gène de fusion correspondant, BCR-ABL, est transcrit en un ARNm de 8,5 kb avec 2 variants de jonction, b2a2 (dans 40 % des cas) et b3a2 (55 % des cas). Il encode une protéine chimère, p210, grâce à une activité de tyrosine kinase intense. Les transcrits b2a3 et b3a3 représentent moins de 5 % des cas. Un chromosome Ph peut également être détecté chez 35 % des patients adultes atteints de LAL.

L'incidence annuelle de la LMC est d'environ 1 à 2 cas sur 100 000 et la maladie représente 20 % des leucémies chez l'adulte. Sur le plan clinique, elle se caractérise par une quantité excessive de cellules myéloïdes qui se différencient et fonctionnent normalement. Dans 90 à 95 % des cas, les patients atteints de LMC sont diagnostiqués en phase chronique ou stable. Auparavant, en l'espace de 4 à 6 ans en moyenne, les patients entraient dans une phase d'accélération débouchant sur une crise blastique ou une leucémie aiguë, toujours fatales. L'avènement de l'imatinib et, plus récemment, des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK), a considérablement modifié l'évolution naturelle de la maladie : la plupart des patients demeurent désormais en rémission et bénéficient d'un suivi à long terme et d'une surveillance de la maladie.

Surveillance de la maladie

Actuellement, l'objectif du traitement de la LMC est un taux de survie à 100 % et un chromosome Ph négatif. La surveillance de la maladie constitue donc un outil essentiel pour évaluer la réponse thérapeutique et détecter toute récurrence de façon précoce chez chaque patient. Sous ITK, les patients passent généralement d'une rémission hématologique à cytogénétique puis

moléculaire, qui correspond à une diminution du nombre de cellules leucémiques et de transcrits BCR-ABL, tel que détaillé dans la figure 1 ci-dessous.

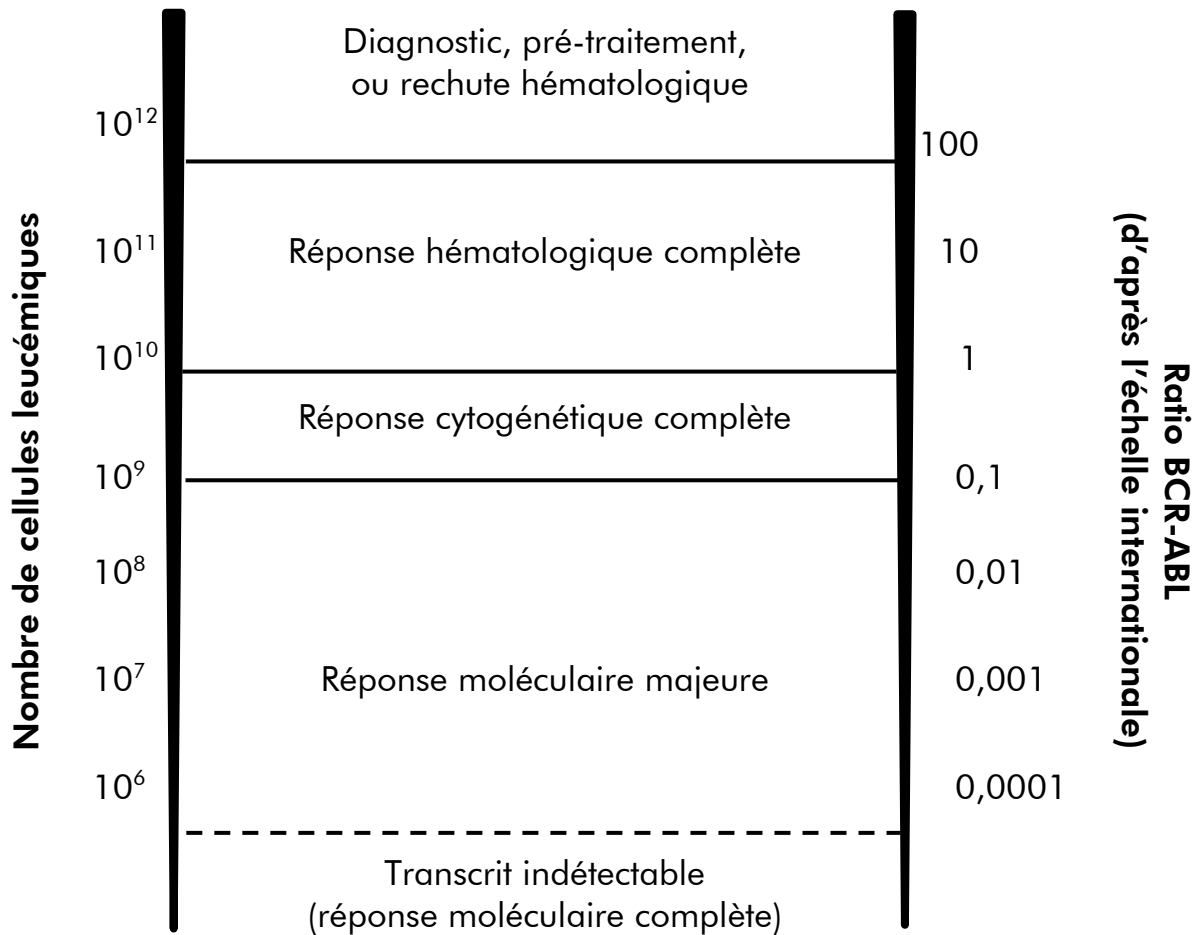


Figure 1. Adaptée d'après la référence 1.

La méthode standard employée pour l'estimation de la charge tumorale chez les patients atteints de LMC est l'analyse cytogénétique conventionnelle (G-banding) sur les métaphases médullaires. La réponse cytogénétique est évaluée sur au moins 20 métaphases médullaires. Le degré de réponse cytogénétique est estimé d'après le pourcentage de métaphases à chromosome Philadelphie positif (voir tableau 1, référence 2). Cette évaluation dépend toutefois de performances du laboratoire et présente une faible sensibilité (5 % pour une analyse de 20 métaphases).

L'amplification en chaîne par polymérase quantitative en temps réel (qPCR), qui permet de quantifier l'ARNm BCR-ABL Mbc sur des échantillons de sang périphérique (SP), fait désormais partie des techniques de surveillance de la LMC sous traitement. Elle s'avère moins invasive que l'analyse cytogénétique des métaphases médullaires et présente une sensibilité accrue.

En outre, les recommandations en matière de surveillance de la LMC ont récemment fait l'objet d'une mise à jour afin d'intégrer les derniers éléments de preuve obtenus lors d'essais cliniques, ainsi que les nouveaux objectifs et outils

de surveillance pathologique. Les toutes dernières recommandations relatives à la définition de la réponse thérapeutique et à la surveillance des patients traités par imatinib ont été formulées par les experts de l'ELN (2).

D'un point de vue technique, les spécialistes internationaux ont fait des efforts pour harmoniser les techniques d'analyse du gène BCR-ABL Mbc_r et de présentation des résultats associés (3–5). Par ailleurs, un panel de référence chapeauté par l'OMS a récemment été validé afin de permettre une standardisation simple de la quantification du gène BCR-ABL (6).

Tableau 1. Recommandations internationales pour la prise en charge des patients atteints de CML (adapté d'après la référence 2)

	Réponse hématologique	Réponse cytogénétique	Réponse moléculaire (ratio du BCR- ABL par rapport au gène contrôle, d'après l'échelle internationale)
Définitions	<p>Complète : Numération des plaquettes < 450 x 10⁹/litre Numération des globules blancs < 10 x 10⁹/litre Différentiel sans granulocytes immatures et avec moins de 5 % de basophiles Rate non palpable</p>	<p>Complète : Ph+ 0 % Partielle : Ph+ 1-35 % Mineure : Ph+ 36-65 % Minimale : Ph+ 66-95 % Absente : Ph+ > 95 %</p>	<p>« Réponse complète » indique que le transcrite est non quantifiable et indétectable Majeure : ≤0,1</p>
Surveillance	<p>Contrôle toutes les 2 semaines jusqu'à obtention d'une réponse complète et confirmée, puis tous les 3 mois sauf en cas de nécessité.</p>	<p>Contrôle au moins tous les 6 mois jusqu'à obtention d'une réponse complète et confirmée, puis au moins tous les 12 mois.</p>	<p>Contrôle tous les 3 mois. Analyse mutationnelle en cas d'échec, de réponse sous-optimale ou d'augmentation du taux de transcrits.</p>

Les réponses hématologique, cytogénétique et moléculaire complètes doivent être confirmées dans le cadre de deux examens consécutifs. La réponse cytogénétique est évaluée par analyse cytogénétique morphologique sur au moins 20 métaphases médullaires. Il convient de ne recourir à l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) des cellules sanguines périphériques que si les cellules médullaires ne peuvent pas être obtenues. La réponse moléculaire est évaluée sur les cellules sanguines périphériques.

Principe de la procédure

La qPCR permet une quantification précise des produits de PCR lors de la phase exponentielle du processus d'amplification par PCR. Les données de qPCR peuvent être rapidement obtenues sans procédure post-PCR par détection en temps réel de signaux fluorescents durant et/ou immédiatement après le cycle de PCR, ce qui réduit considérablement le risque de contamination des produits de PCR. Il existe actuellement 3 principales techniques de qPCR : l'analyse qPCR qui utilise le marqueur SYBR Green I[®], celle qui utilise l'hydrolyse des sondes, et celle qui utilise l'hybridation des sondes.

Ce test exploite le principe de la qPCR par hydrolyse des oligonucléotides doublement marqués. Au cours de la PCR, les amorces sens et anti-sens sont hybridées à une séquence spécifique (figure 2). Ce mélange contient également un oligonucléotide doublement marqué. Cette sonde, composée d'un oligonucléotide marqué avec un marqueur de fluorescence (reporter) 5' et un chélateur de fluorescence (quencher) 3' en aval, s'hybride à une séquence cible au sein du produit de PCR. L'analyse qPCR au moyen des sondes hydrolysées exploite l'activité exonucléase 5'→3' de l'ADN polymérase *Thermus aquaticus* (*Taq*). Quand la sonde est intacte, la proximité du reporter et du quencher entraîne la suppression de la fluorescence du reporter, essentiellement en raison d'un transfert d'énergie de type Förster.

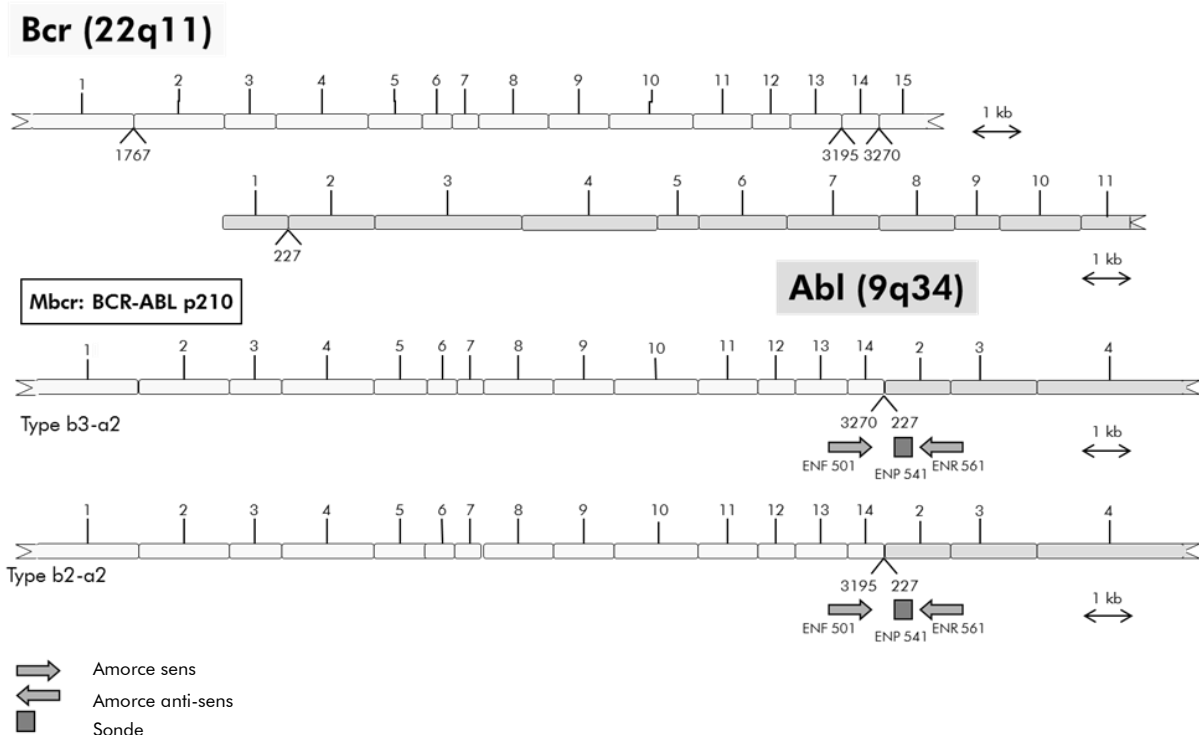


Figure 2. Représentation schématique du transcrit du FG BCR-ABL Mbcr couvert par le jeu de sonde et amorces pour qPCR : ENF501–ENP541–ENR561. Le numéro qui figure sous les amorces et la sonde désigne la position du nucléotide dans le transcrit du gène normal.

Durant la PCR, si la cible d'intérêt est présente, la sonde se fixe spécifiquement entre les sites où sont hybridées les amorces sens et anti-sens. L'activité exonucléase 5'→3' de l'ADN polymérase clive la sonde entre le reporter et le quencher si celle-ci est hybridée à la cible. Les fragments de sonde sont alors déplacés de la cible et la polymérisation du brin se poursuit. L'extrémité 3' de la sonde est bloquée pour empêcher l'extension de cette dernière au cours de la PCR (figure 3). Ce processus intervient à chaque cycle et n'interfère pas avec l'accumulation exponentielle du produit.

L'augmentation du signal fluorescent n'est détectée que si la séquence cible est complémentaire de la sonde et donc amplifiée durant la PCR. Du fait de ces exigences, l'amplification non spécifique n'est pas détectée. Ainsi, l'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle à l'amplification de la cible durant la PCR.

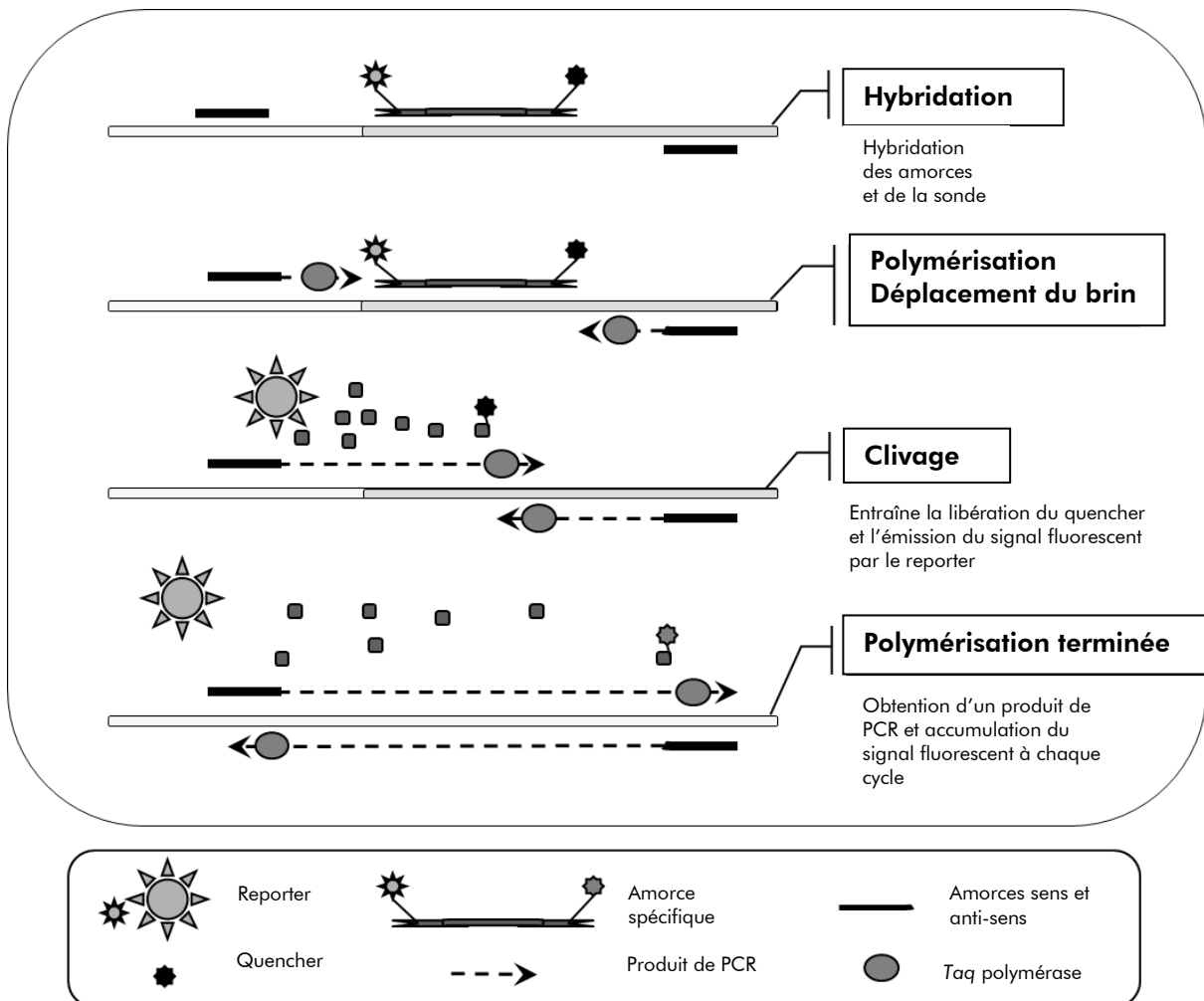


Figure 3. Principe de la réaction. L'ARN total fait l'objet d'une transcription inverse et l'ADNc généré est amplifié par PCR à l'aide de deux amorces spécifiques et d'une sonde doublement marquée interne spécifique (FAM™–TAMRA™). À chaque étape d'hybridation induite par la PCR, la sonde se fixe à l'amplicon. L'extension de l'ADN polymérase Taq de l'amorce fixée à l'amplicon déplace l'extrémité 5' de la sonde qui est alors dégradée par l'activité exonucléase 5'→3' de l'ADN polymérase Taq. Le clivage se poursuit jusqu'à ce que le reste de la sonde fusionne avec l'amplicon. Ce processus libère le fluorophore et le

quencher dans la solution, les séparant physiquement, ce qui augmente la fluorescence de la sonde FAM et diminue celle de la sonde TAMRA.

Matériel fourni

Contenu du kit

Manuel du kit <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc		(24)
Référence		670123
Nombre de réactions		24
ABL Control Gene Standard Dilution (Dilution standard pour le gène contrôle ABL) (10 ³ copies/5 µl)	C1-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (Dilution standard pour le gène contrôle ABL) (10 ⁴ copies/5 µl)	C2-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (Dilution standard pour le gène contrôle ABL) (10 ⁵ copies/5 µl)	C3-ABL	50 µl
BCR-ABL Mbc Fusion Gene Standard Dilution (Dilution standard pour le gène de fusion BCR-ABL Mbc) (10 ¹ copies/5 µl)	F1-BCR-ABL Mbc	50 µl
BCR-ABL Mbc Fusion Gene Standard Dilution (Dilution standard pour le gène de fusion BCR-ABL Mbc) (10 ² copies/5 µl)	F2-BCR-ABL Mbc	50 µl
BCR-ABL Mbc Fusion Gene Standard Dilution (Dilution standard pour le gène de fusion BCR-ABL Mbc) (10 ³ copies/5 µl)	F3-BCR-ABL Mbc	50 µl
BCR-ABL Mbc Fusion Gene Standard Dilution (Dilution standard pour le gène de fusion BCR-ABL Mbc) (10 ⁵ copies/5 µl)	F4-BCR-ABL Mbc	50 µl
BCR-ABL Mbc Fusion Gene Standard Dilution (Dilution standard pour le gène de fusion BCR-ABL Mbc) (10 ⁶ copies/5 µl)	F5-BCR-ABL Mbc	50 µl
Primers and Probe Mix ABL (Mélange sonde et amorces ABL)*	PPC-ABL 25x	90 µl

* Mélange d'amorces sens et anti-sens pour le gène contrôle ABL associé à une sonde FAM-TAMRA spécifique.

Manuel du kit <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc		(24)
Référence		670123
Nombre de réactions		24
Primers and Probe Mix BCR-ABL Mbc Fusion Gene (Mélange sonde et amorces de détection du gène de fusion BCR-ABL Mbc) [†]	PPF-Mbc 25x	110 µl
<i>ipsogen BCR-ABL Mbc Kit Handbook</i> (anglais)		1

[†] Mélange d'amorces sens et anti-sens spécifiques pour le gène de fusion BCR-ABL Mbc associé à une sonde FAM-TAMRA spécifique.

Remarque : centrifuger brièvement les dilutions standard et les mélanges sonde et amorce avant utilisation.

Matériel nécessaire mais non fourni

En cas de manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées disponibles auprès du fournisseur du produit.

Réactifs

- Eau exempte de nucléase pour PCR
- Réactifs de transcription inverse : le réactif validé est la transcriptase inverse Superscript[®] II (ou Superscript), qui inclut 5X First-Strand Buffer et DTT 100 mM (Life Technologies, réf. 18064-022).
- Inhibiteur des RNases : le réactif validé est RNaseOUT[™] (Life Technologies, réf. 10777-019).
- Jeu de dNTP, grade PCR
- Hexamère aléatoire
- MgCl₂
- Tampon et ADN polymérase Taq : les réactifs validés sont TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (mélange maître PCR 2x) (Life Technologies, réf. 4304437) et LightCycler TaqMan Master (mélange maître PCR 5x) (Roche, réf. 04535286001).

Consommables

- Cônes de pipette pour PCR avec filtre hydrophobe, stériles, exempts de nucléase et aérosol-résistants

- Tubes pour PCR exempts de RNase et de DNase de 0,5 ou 0,2 ml
- Glace

Équipement

- Pipette microlitre* spéciale PCR (1–10 µl ; 10–100 µl ; 100–1 000 µl)
- Micro-centrifugeuse* avec rotor pour tubes de réaction de 0,2 ml/0,5 ml (capable d'atteindre les 10 000 tpm)
- Système de PCR en temps réel :* Rotor-Gene Q 5plex HRM ou autre séquenceur Rotor
- Thermocycleur* ou bain-marie* (étape de transcription inverse)

Réactifs complémentaires

- *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Control Kit (Kit de témoins *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc) (réf. 670191), contenant des lignées cellulaires caractérisées par une expression négative, élevée et faiblement positive du gène de fusion BCR-ABL Mbc en vue de la validation qualitative de l'extraction de l'ARN, et de la transcription inverse.

Avertissements et précautions

Pour utilisation en diagnostic *in vitro*

En cas de manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne au format PDF (pratique et compact) à l'adresse www.qiagen.com/safety où vous pouvez trouver, consulter et imprimer les SDS pour chaque kit et élément de kit QIAGEN.

Mettre au rebut les déchets d'échantillons et de tests conformément aux règles de sécurité locales.

* S'assurer que tous les instruments sont vérifiés et calibrés selon les recommandations du fabricant.

Précautions générales

Les tests de qPCR nécessitent la mise en place de bonnes pratiques de laboratoire, incluant la maintenance de l'équipement, spécifiques à la biologie moléculaire et en accord avec les réglementations applicables et les normes pertinentes.

Ce kit est destiné au diagnostic *in vitro*. Les réactifs et les instructions fournis dans ce kit ont été validés pour obtenir des performances optimales. Des dilutions supplémentaires des réactifs ou une modification des temps d'incubation et des températures peuvent engendrer des données aberrantes ou erronées. Les réactifs PPC et PPF peuvent être altérés en cas d'exposition à la lumière. Tous les réactifs sont formulés spécifiquement pour être utilisés dans le cadre de ce test. Pour garantir les performances optimales du test, aucune substitution ne doit être faite.

La détermination du taux de transcrits par qPCR implique à la fois la transcription inverse de l'ARNm et l'amplification de l'ADNc généré par la PCR. L'intégralité de la procédure doit donc être réalisée dans des conditions exemptes de RNase/DNase.

Prendre des précautions afin de prévenir :

- toute contamination par RNase/DNase, susceptible d'induire une dégradation de la matrice d'ARNm et de l'ADNc généré.
- toute contamination croisée par l'ARNm ou les produits de PCR susceptible de générer des signaux faux positifs.

Nous recommandons par conséquent :

- d'utiliser des consommables exempts de nucléase (par ex. pipettes, cônes, tubes) et de porter des gants lors de l'expérience.
- d'utiliser de nouveaux cônes aérosol-résistants à toutes les étapes de pipetage pour éviter les contaminations croisées des échantillons et des réactifs.
- de préparer le pré-mélange pour PCR avec du matériel dédié (pipettes, cônes, etc.) dans une zone où aucune matrice d'ADN (ADNc, ADN, plasmides) n'est introduite. Ajouter les échantillons dans une zone séparée (de préférence dans une autre pièce) avec du matériel dédié (pipettes, cônes, etc.).
- de manipuler les dilutions standard (C1–3 et F1–5) dans une pièce séparée.

Conservation et manipulation des réactifs

Les kits sont expédiés en carboglace et doivent être stockés entre -30 °C et -15 °C à réception.

- Limiter l'exposition des mélanges sonde et amorces à la lumière (tubes PPC et PPF).
- Mélanger et centrifuger doucement les tubes avant leur ouverture.
- Stocker tous les composants du kit dans leur contenant d'origine.

Ces conditions de stockage s'appliquent aux composants ouverts ou non. Tous les composants stockés dans des conditions autres que celles mentionnées sur l'étiquetage peuvent ne pas fonctionner correctement et affecter les résultats des tests.

Les dates de péremption de chaque réactif sont mentionnées sur les étiquettes individuelles de chaque composant. Dans des conditions de stockage adéquates, le produit conservera ses performances jusqu'à la date imprimée sur l'étiquetage.

Il n'y a pas de signe visible indiquant une chute de stabilité du produit. Cependant les témoins positifs et négatifs doivent être analysés systématiquement en parallèle de l'échantillon à quantifier.

Procédure

Préparation de l'échantillon d'ARN

La préparation de l'ARN à partir des échantillons patient (sang et moelle osseuse) doit avoir été réalisée conformément à une procédure validée. La qualité du test dépend en grande partie de la qualité de l'ARN utilisé. Par conséquent, il est recommandé de vérifier la qualité de l'ARN purifié par électrophorèse sur gel d'agarose* ou au moyen de l'Agilent® Bioanalyzer® avant toute analyse.

Protocole : Protocole EAC de transcription inverse standardisé et recommandé

À faire avant de commencer

- Préparer les dNTP, 10 mM chacun. Conserver en aliquotes à -20 °C.

Procédure

1. **Décongeler tous les composants nécessaires et les mettre sur la glace.**
2. **Incuber 1 µg d'ARN (1-4 µl) pendant 10 minutes à 70 °C et le laisser immédiatement refroidir sur la glace pendant 5 minutes.**
3. **Centrifuger brièvement (pendant environ 10 secondes, 10 000 tpm) pour recueillir le liquide dans le fond du tube. Conserver sur la glace.**
4. **Préparer le mélange TI (transcription inverse) suivant en fonction du nombre d'échantillons analysés (tableau 2).**

* En cas de manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats.

Tableau 2. Préparation du mélange TI

Composant	Volume final par échantillon (μl)	Concentration finale
First-Strand Buffer (fourni avec la transcriptase inverse Superscript II), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP (10 mM chacun, à préparer à l'avance et conserver en aliquotes à – 20 °C)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, fourni avec la transcriptase inverse Superscript II)	2,0	10 mM
Inhibiteur des RNases (40 U/ μ l)	0,5	1 U/ μ l
Hexamère aléatoire (100 μ M)	5,0	25 μ M
Transcriptase inverse Superscript II ou Superscript (200 U/ μ l)	0,5	5 U/ μ l
Échantillon d'ARN chauffé (à ajouter à l'étape 5)	1,0–4,0	50 ng/ μ l
Eau exempte de nucléase pour PCR (à ajouter à l'étape 5)	0,0–3,0	–
Volume final	20,0	–

- 5. Pipeter 16 μ l du mélange TI dans chaque tube de PCR. Ajouter ensuite 1 à 4 μ l (1 μ g) d'ARN (obtenu à l'étape 3) et ajuster le volume à 20 μ l avec de l'eau exempte de nucléase pour PCR (voir tableau 3).**

Tableau 3. Préparation de la réaction par transcription inverse

Composant	Volume (μl) (Volume (μl))
Mélange TI	16
Échantillon d'ARN chauffé (1 μ g)	1–4
Eau exempte de nucléase pour PCR	0–3
Volume final	20

- 6. Bien mélanger et centrifuger brièvement (pendant environ 10 secondes, 10 000 tpm) pour recueillir le liquide dans le fond du tube.**
- 7. Procéder à une incubation à 20 °C pendant 10 minutes.**
- 8. Incuber à 42 °C dans un thermocycleur pendant 45 minutes, puis immédiatement à 99 °C pendant 3 minutes.**
- 9. Laisser refroidir sur la glace (pour arrêter la réaction) pendant 5 minutes.**
- 10. Centrifuger brièvement (pendant environ 10 secondes, 10 000 tpm) pour recueillir le liquide dans le fond du tube. Conserver sur la glace.**
- 11. Diluer l'ADNc résultant avec 30 μ l d'eau exempte de nucléase pour PCR afin d'obtenir un volume final de 50 μ l.**
- 12. Procéder à la PCR conformément aux protocoles suivants, suivant l'appareil de qPCR utilisé.**

Protocole : Réalisation d'une qPCR sur un appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ou Rotor-Gene Q 5plex HRM avec rotor de 72 tubes

Avec ces appareils, il est recommandé de dupliquer toutes les mesures, comme indiqué dans le tableau 4.

Tableau 4. Nombre de réactions sur un appareil Rotor-Gene Q avec rotor de 72 tubes

Échantillons	Réactions
Avec les mélanges sonde et amorces ABL (PPC-ABL)	
n échantillons d'ADNc	n x 2 réactions
Standard ABL	2 x 3 réactions (3 dilutions, chacun testé en double)
Contrôle H ₂ O	2 réactions
Avec le mélange sonde et amorces BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc)	
n échantillons d'ADNc	n x 2 réactions
Standard Mbc	2 x 5 réactions (5 dilutions, chacun testé en double)
Contrôle H ₂ O	2 réactions

Analyse des échantillons sur un appareil Rotor-Gene® Q avec rotor de 72 tubes

Il est recommandé de tester au moins 8 échantillons d'ADNc au cours de la même expérience afin d'optimiser l'utilisation des standards et des mélanges sonde et amorces. Chaque kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc contient suffisamment de réactifs pour réaliser 3 expériences sur 8 échantillons sur un rotor de 72 tubes.

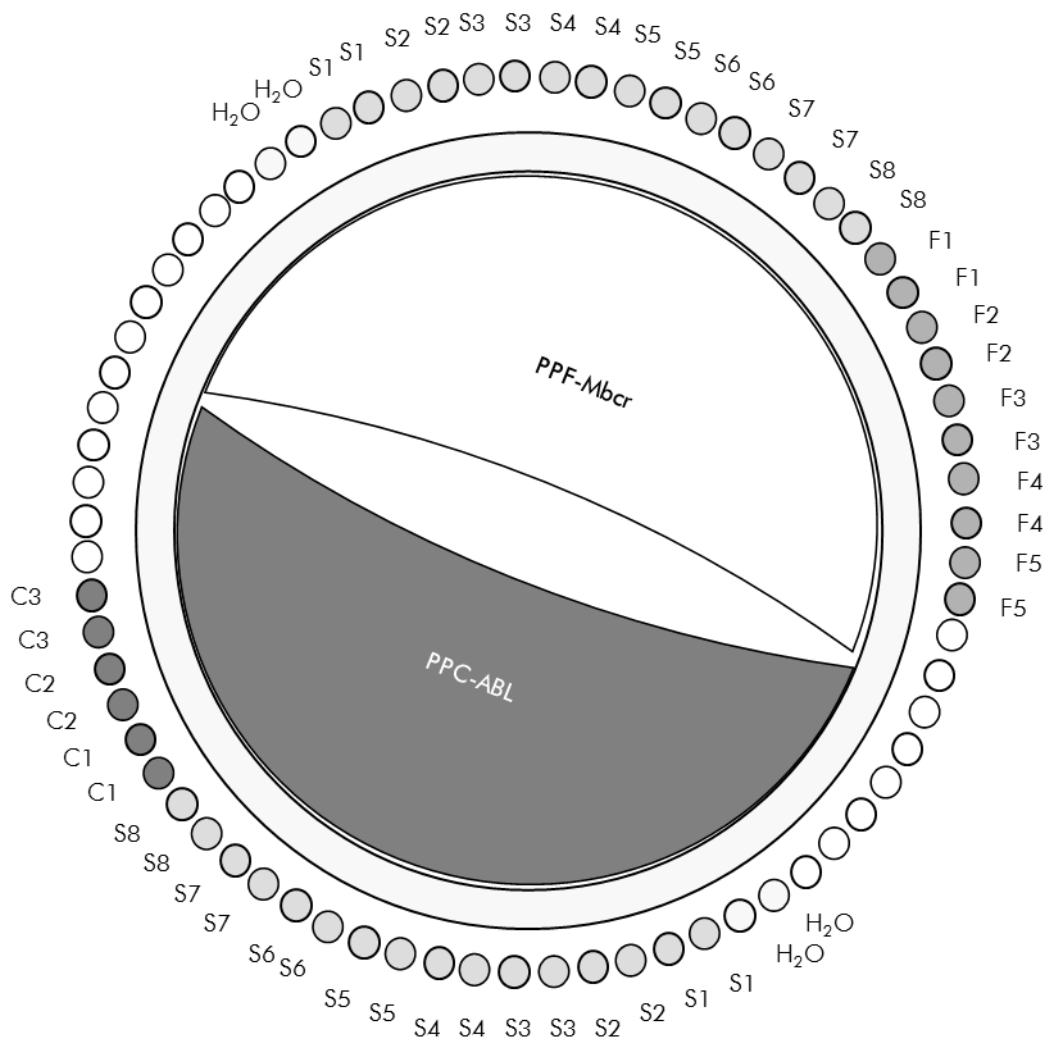


Figure 4. Suggestion de configuration du rotor pour chaque expérience réalisée à l'aide du kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr. F1–5 : standards BCR-ABL Mbcr ; C1–3 : standards ABL ; S : échantillon d'ADNc ; H₂O : contrôle H₂O.

Remarque : veiller à toujours positionner un échantillon à tester en position 1 du rotor. Dans le cas contraire, durant la phase de calibration, l'instrument n'effectuera pas de calibration et des données de fluorescence erronées seront acquises.

Compléter toutes les autres positions avec des tubes vides.

Réalisation d'une qPCR sur un appareil Rotor-Gene® Q avec rotor de 72 tubes

Remarque : réaliser toutes les étapes sur la glace.

Procédure

- 1. Décongeler tous les composants nécessaires et les mettre sur la glace.**

2. Préparer les mélanges de qPCR suivants selon le nombre d'échantillons à analyser :

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Le tableau 5 décrit le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs, calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 25 μ l. Selon le nombre de réactions, un pré-mélange peut être préparé à l'aide du même mélange sonde et amorces (soit PPC-ABL, soit PPF-Mbcr). Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

Tableau 5. Préparation du mélange de qPCR

Composant	1 réaction (μ l)	ABL : 24 + 1 réactions (μ l)	BCR-ABL Mbcr : 28 + 1 réactions (μ l)	Concentration finale
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Mélange sonde et amorces, 25x	1	25	29	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	6,5	162,5	188,5	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 4)	5	5 chacun	5 chacun	–
Volume total	25	25 chacun	25 chacun	–

3. Déposer 20 μ l du pré-mélange de qPCR par tube.

4. Ajouter 5 μ l du produit de TI (ADNc, 100 ng équivalent ARN) obtenu lors de la transcription inverse (voir « Protocole : Protocole EAC de

transcription inverse standardisé et recommandé », page 16) dans le tube correspondant (volume total 25 µl).

5. Mélanger doucement en pipetant.
6. Placer les tubes dans le thermocycleur en suivant les recommandations du fabricant.
7. Paramétrer le programme de thermocyclage du Rotor-Gene Q comme indiqué dans le tableau 6.

Tableau 6. Profil de température

Mode d'analyse :	Quantitation
Maintien	Température : 50 °C Durée : 2 min
Maintien 2	Température : 95 °C Durée : 10 min
Cyclage	50 fois 95 °C pendant 15 sec 60 °C pendant 1 min pour l'acquisition de la fluorescence FAM dans le canal Green : Single

8. Sur un appareil Rotor-Gene Q, sélectionner le paramètre d'analyse « Slope Correct » (Correction de la pente). Il est recommandé de définir la valeur de seuil à 0,03. Lancer le programme de thermocyclage, comme indiqué dans le tableau 6.

Protocole : Réalisation d'une qPCR sur un appareil ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900HT SDS ou LightCycler 480

En cas d'utilisation d'un appareil de qPCR à plaque de 96 puits, il est recommandé de dupliquer toutes les mesures, comme indiqué dans le tableau 7.

Tableau 7. Nombre de réactions en cas d'utilisation d'un appareil de qPCR à plaque de 96 puits

Échantillons	Réactions
Avec les mélanges sonde et amorces ABL (PPC-ABL)	
n échantillons d'ADNc	n x 2 réactions
Standard ABL	2 x 3 réactions (3 dilutions, chacun testé en double)
Contrôle H ₂ O	2 réactions
Avec le mélange sonde et amorces BCR-ABL Mbcr (PPF-Mbcr)	
n échantillons d'ADNc	n x 2 réactions
Standard Mbcr	2 x 5 réactions (5 dilutions, chacun testé en double)
Contrôle H ₂ O	2 réactions

Analyse des échantillons sur un appareil ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900 SDS ou LightCycler 480

Il est recommandé de tester au moins 8 échantillons d'ADNc au cours de la même expérience afin d'optimiser l'utilisation des standards et des mélanges sonde et amorces. Le schéma de plaque représenté par la figure 5 montre un exemple d'une telle expérience.

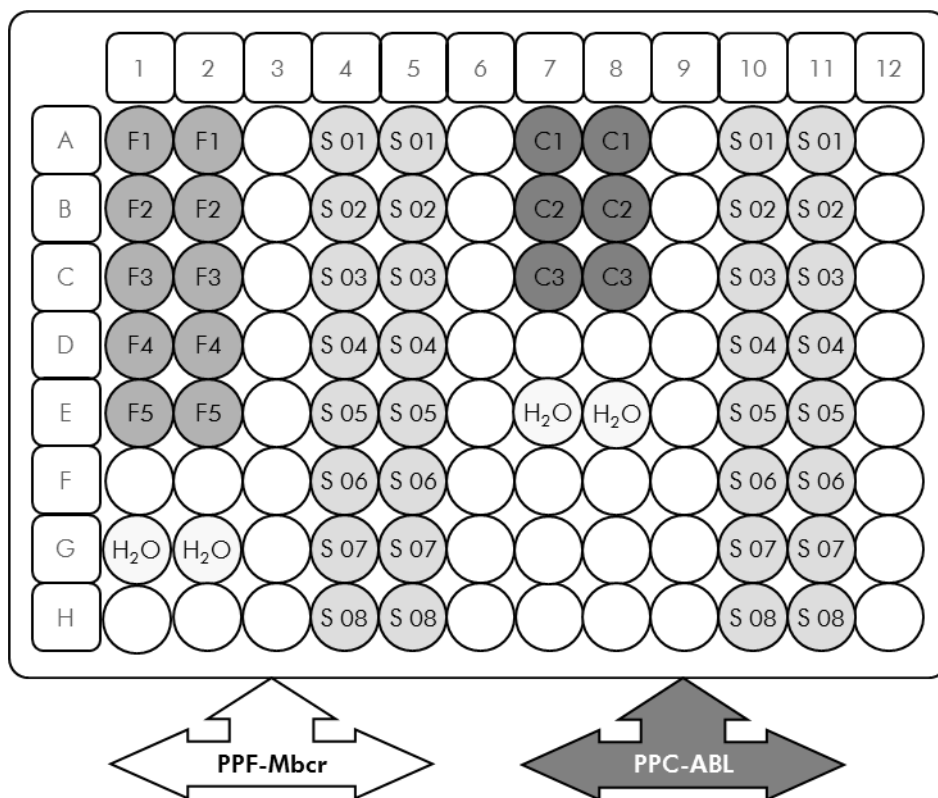


Figure 5. Suggestion de configuration de plaque pour une expérience. S : échantillon d'ADNc ; F1–5 : standards BCR-ABL Mbcr ; C1–3 : standards ABL ; H₂O : contrôle H₂O.

Réalisation d'une qPCR sur un appareil ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900 SDS ou LightCycler 480

Remarque : réaliser toutes les étapes sur la glace.

Procédure

- Décongeler tous les composants nécessaires et les mettre sur la glace.**
- Préparer les mélanges de qPCR suivants selon le nombre d'échantillons à analyser : lors de l'utilisation d'une plaque de 96 puits, il est recommandé d'effectuer toutes les mesures en double.**

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Le tableau 8 décrit le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs, calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 25 µl. Selon le nombre de réactions, un pré-mélange peut être préparé à l'aide du même mélange sonde et amorces (soit PPC-ABL, soit PPF-Mbcr). Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

Tableau 8. Préparation du mélange de qPCR

Composant	1 réaction (μ l)	ABL : 24 + 1 réactions (μ l)	BCR-ABL Mbc : 28 + 1 réactions (μ l)	Concentration finale
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Mélange sonde et amorces, 25x	1	25	29	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	6,5	162,5	188,5	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 4)	5	5 chacun	5 chacun	–
Volume total	25	25 chacun	25 chacun	–

3. Déposer 20 μ l du pré-mélange de qPCR par puits.
4. Ajouter 5 μ l du produit de TI (ADNc, 100 ng équivalent ARN) obtenu lors de la transcription inverse (voir « Protocole : Protocole EAC de transcription inverse standardisé et recommandé », page 16) dans le puits correspondant (volume total 25 μ l).
5. Mélanger doucement en pipetant.
6. Fermer la plaque et centrifuger brièvement (300 x g, pendant environ 10 secondes)
7. Placer la plaque dans le thermocycleur en suivant les recommandations du fabricant. Paramétrer le programme de thermocyclage tel qu'indiqué dans le tableau 9 pour les appareils ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900HT SDS, ou conformément au tableau 10 en cas d'utilisation d'un LightCycler 480.

Tableau 9. Profil de température pour ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900HT SDS

Mode d'analyse :	Courbe standard — Quantification absolue
Maintien	Température : 50 °C Durée : 2 minutes
Maintien 2	Température : 95 °C Durée : 10 minutes
Cyclage	50 fois 95 °C pendant 15 secondes 60 °C pendant 1 minute avec acquisition de la fluorescence FAM ; quencher : TAMRA

Tableau 10. Profil de température pour le LightCycler 480

Mode d'analyse :	Quantification absolue (« Abs Quant »)
Formats de détection	Sélectionner « Simple Probe » (Sonde simple) dans la fenêtre « Detection formats ».
Maintien	Température : 50 °C Durée : 2 minutes
Maintien 2	Température : 95 °C Durée : 10 minutes
Cyclage	50 fois 95 °C pendant 15 secondes 60 °C pendant 1 minute avec acquisition de la fluorescence FAM correspondant à (483 nm-533 nm) pour le LC version 01 et (465 nm-510 nm) pour le LC version 02.

8. Pour les systèmes ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900HT SDS, suivre l'étape 8a. Pour le LightCycler 480, se référer à l'étape 8b.

8a. ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900HT SDS : lors de l'analyse de l'ABI PRISM SDS, il est recommandé de définir le seuil à 0,1 comme décrit dans le protocole EAC et la valeur de référence entre les cycles 3 et

15. Lancer le programme de thermocyclage, tel qu'indiqué dans le tableau 9.

8b. LightCycler 480 : il est recommandé de recourir au mode d'analyse « Fit point » avec bruit de fond à 2,0 et seuil à 2,0. Lancer le programme de thermocyclage, comme indiqué dans le tableau 10.

Protocole : Réalisation d'une qPCR sur un appareil LightCycler 1.2 ou 2.0

En cas d'utilisation de séquenceurs capillaires, il est recommandé de mesurer les échantillons en double, et les témoins en simple exemplaire, tel qu'indiqué dans le tableau 11.

Tableau 11. Nombre de réactions sur un appareil LightCycler 1.2 ou 2.0

Échantillons	Réactions
Avec les mélanges sonde et amorces ABL (PPC-ABL)	
n échantillons d'ADNc	n x 2 réactions
Standard ABL	1 x 3 réactions (3 dilutions standard, chacune testée une fois)
Contrôle H ₂ O	1 réaction
Avec le mélange sonde et amorces BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc)	
n échantillons d'ADNc	n x 2 réactions
Standard Mbc	1 x 5 réactions (5 dilutions standard, chacune testée une fois)
Contrôle H ₂ O	1 réaction

Analyse des échantillons sur un appareil LightCycler 1.2 ou 2.0

Il est recommandé de tester au moins 5 échantillons d'ADNc au cours de la même expérience afin d'optimiser l'utilisation des standards et des mélanges sonde et amorces. Le schéma représenté par la figure 6 montre un exemple d'une telle expérience.

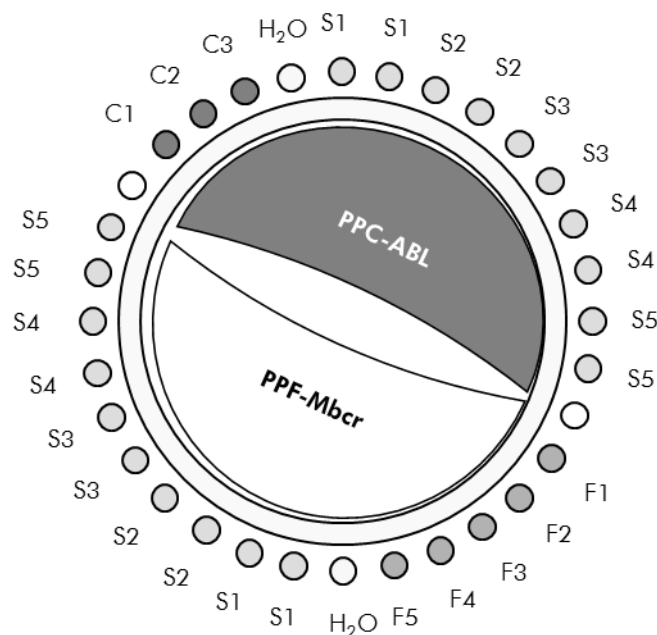


Figure 6. Suggestion de configuration du rotor pour chaque expérience réalisée à l'aide du kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr. F1–5 : standards BCR-ABL Mbcr ; C1–3 : standards ABL ; S : échantillon d'ADN inconnu à analyser ; H₂O : contrôle H₂O.

Réalisation d'une qPCR sur un appareil LightCycler 1.2 ou 2.0

Remarque : en raison de certaines exigences technologiques, les expériences sur LightCycler doivent être effectuées à l'aide des réactifs prévus à cet effet. Il est recommandé d'utiliser le réactif LightCycler TaqMan Master et de se conformer aux instructions du fabricant pour la préparation du mélange maître 5x.

Remarque : réaliser toutes les étapes sur la glace.

Procédure

1. **Décongeler tous les composants nécessaires et les mettre sur la glace.**
2. **Préparer les mélanges de qPCR suivants selon le nombre d'échantillons à analyser :**

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Le tableau 12 décrit le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs, calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 20 µl. Selon le nombre de réactions, un pré-mélange peut être préparé à l'aide du même mélange sonde et amorces (soit PPC-ABL, soit PPF-Mbcr). Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

Tableau 12. Préparation du mélange de qPCR

Composant	1 réaction 14 + 1 (µl)	ABL : 16 + 1 réactions (µl)	BCR-ABL 16 + 1 réactions (µl)	Mbcr : 16 + 1 réactions Concentration finale
LightCycler TaqMan Master Mix, 5x, préparé extemporanément	4,0	60	68,0	1x
Mélange sonde et amorces, 25x	0,8	12	13,6	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	10,2	153	173,4	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 4)	5,0	5 chacun	5,0 chacun	–
Volume total	20,0	20 chacun	20,0 chacun	–

- 3. Déposer 15 µl du pré-mélange de qPCR par capillaire.**
- 4. Ajouter 5 µl du produit de TI (ADNc, 100 ng équivalent ARN) obtenu lors de la transcription inverse (voir « Protocole : Protocole EAC de transcription inverse standardisé et recommandé », page 16) dans le tube correspondant (volume total 20 µl).**
- 5. Mélanger doucement en pipetant.**
- 6. Disposer les capillaires dans les adaptateurs fournis avec l'appareil et centrifuger brièvement (700 x g, pendant environ 10 secondes).**
- 7. Placer les capillaires dans le thermocycleur en suivant les recommandations du fabricant.**
- 8. Paramétrer le programme de thermocyclage du LightCycler 1.2 ou 2.0 comme indiqué dans le tableau 13.**

Tableau 13. Profil de température

Mode d'analyse :	Quantification
Maintien	Température : 95 °C Durée : 10 minutes Rampe : 20
Cyclage	50 fois 95 °C pendant 10 secondes ; rampe : 20 60 °C pendant 1 minute ; rampe : 20 ; avec acquisition de la fluorescence FAM : Single
Maintien 2	45 °C pendant 1 minute ; rampe : 20

9. Pour le LightCycler 1.2, suivre l'étape 9a. Pour le LightCycler 2.0, se référer à l'étape 9b.
- 9a. LightCycler 1.2 : L'utilisation du mode F1/F2 et « 2nd derivative analysis » (2^e analyse dérivative) est recommandée. Lancer le programme de thermocyclage, comme indiqué dans le tableau 13.
- 9b. LightCycler 2.0 : Afin d'obtenir des résultats reproductibles, il est recommandé de recourir à l'analyse Automated (F''max) (Automatique [F''max]) sur LightCycler 2.0 Software version 4.0. Lancer le programme de thermocyclage, comme indiqué dans le tableau 13.

Protocole : Réalisation d'une qPCR sur un appareil SmartCycler

En cas d'utilisation de ce séquenceur, il est recommandé de mesurer les échantillons en double, et les témoins en simple exemplaire, comme indiqué dans le tableau 14.

Tableau 14. Nombre de réactions pour l'appareil SmartCycler

Échantillons	Réactions
Avec les mélanges sonde et amorces ABL (PPC-ABL)	
n échantillons d'ADNc	n x 2 réactions
Standard ABL	1 x 3 réactions (3 dilutions standard, chacune testée une fois)
Contrôle H ₂ O	1 réaction
Avec le mélange sonde et amorces BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc)	
n échantillons d'ADNc	n x 2 réactions
Standard Mbc	1 x 5 réactions (5 dilutions standard, chacune testée une fois)
Contrôle H ₂ O	1 réaction

Analyse des échantillons sur un appareil SmartCycler

Il est recommandé de tester au moins 5 échantillons d'ADNc au cours de la même expérience afin d'optimiser l'utilisation des standards et des mélanges sonde et amorces. Le schéma représenté par la figure 7 montre un exemple d'une telle expérience.

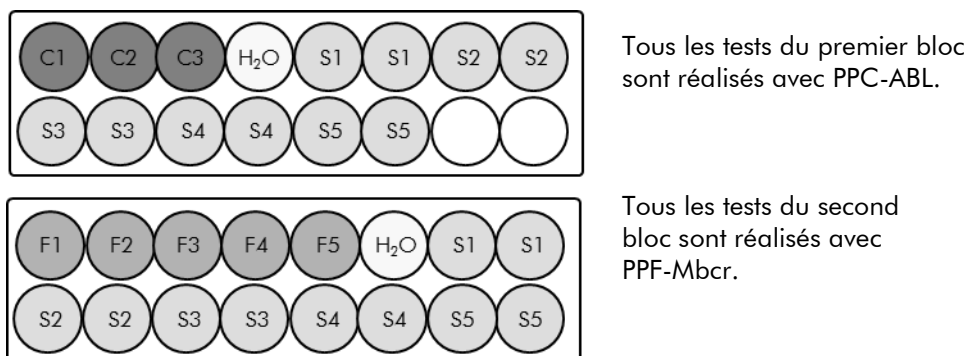


Figure 7. Suggestion de configuration de plaque pour une expérience. S : échantillon d'ADNc ; F1–5 : standards BCR-ABL Mbcr ; C1–3 : standards ABL ; H₂O : contrôle H₂O.

Réalisation d'une qPCR sur un appareil SmartCycler

Remarque : réaliser toutes les étapes sur la glace.

Procédure

- Décongeler tous les composants nécessaires et les mettre sur la glace.**
- Préparer les mélanges de qPCR suivants selon le nombre d'échantillons à analyser :**

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Le tableau 15 décrit le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs, calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 25 µl. Selon le nombre de réactions, un pré-mélange peut être préparé à l'aide du même mélange sonde et amorces (soit PPC-ABL, soit PPF-Mbcr). Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

Tableau 15. Préparation du mélange de qPCR

Composant	1 réaction (μl)	ABL : 14 + 1 réactions (μl)	BCR-ABL Mbc : 16 + 1 réactions (μl)	Concentration finale
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Mélange sonde et amorces, 25x	1	15	17	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	6,5	97,5	110,5	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 4)	5	5 chacun	5 chacun	–
Volume total	25	25 chacun	25 chacun	–

3. Déposer 20 μ l du pré-mélange de qPCR par puits.
4. Ajouter 5 μ l du produit de TI (ADNc, 100 ng équivalent ARN) obtenu lors de la transcription inverse (voir « Protocole : Protocole EAC de transcription inverse standardisé et recommandé », page 16) dans le puits correspondant (volume total 25 μ l).
5. Mélanger doucement en pipetant.
6. Charger les échantillons dans le thermocycleur en suivant les recommandations du fabricant.
7. Paramétrer le programme de thermocyclage du SmartCycler comme indiqué dans le tableau 16.

Tableau 16. Profil de température

Maintien	Température : 50 °C Durée : 2 minutes
Maintien 2	Température : 95 °C Durée : 10 minutes
Cyclage	50 fois 95 °C pendant 15 secondes 60 °C pendant 1 minute avec acquisition : Single

- 8. Il est recommandé de définir le seuil à 30. Lancer le programme de thermocyclage, comme indiqué dans le tableau 16.**

Interprétation des résultats

Principe d'analyse des données

Lorsque l'on fait appel à la technologie TaqMan, le nombre de cycles de PCR nécessaire pour détecter un signal au-dessus du seuil est appelé « Cycle threshold » (C_T) et est directement proportionnel à la quantité de matériel cible présent au début de la réaction.

En utilisant des standards ayant un nombre connu de molécules, on peut établir une courbe standard et ainsi déterminer la quantité de cible exacte présente dans l'échantillon. Les courbes standard d'*ipsogen* sont basées sur les plasmides ; nous utilisons 3 dilutions plasmidiques standard pour le gène contrôle (CG) et 5 dilutions standard pour le gène de fusion (FG) afin de garantir la précision des courbes standard. Les figures 8 et 9 montrent un exemple de courbes d'amplification TaqMan obtenues à l'aide du kit *ipsogen* BCR-ABL Mbc.

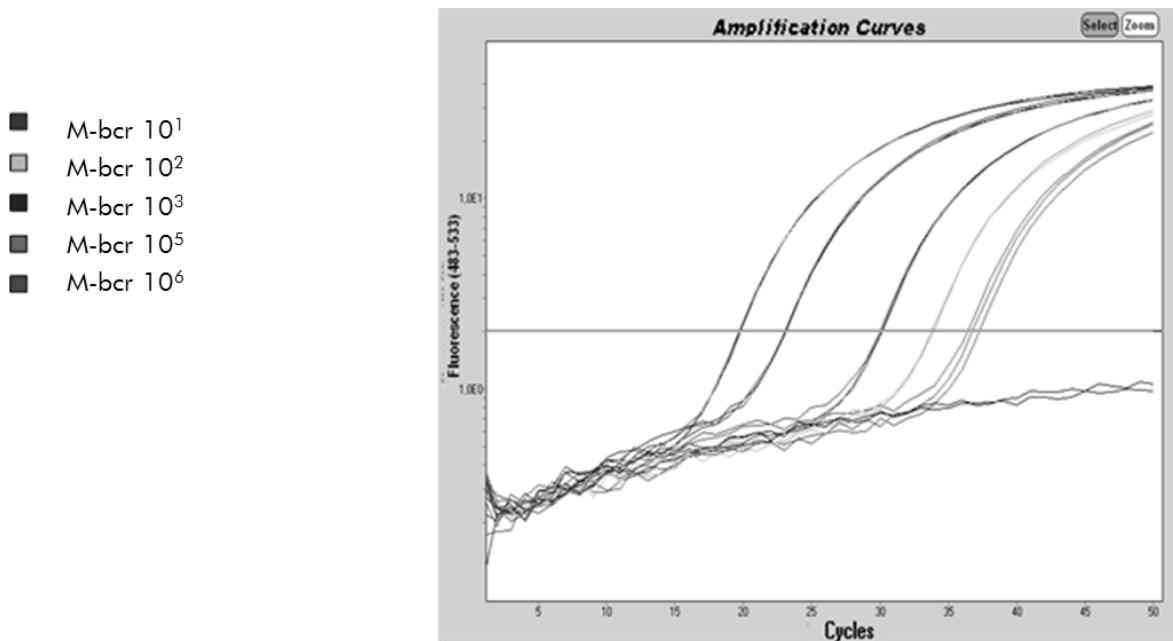


Figure 8. Détection des standards BCR-ABL Mbc (F1–F5). 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 copies/ 5μ l.

- ABL 10³
- ABL 10⁴
- ABL 10⁵

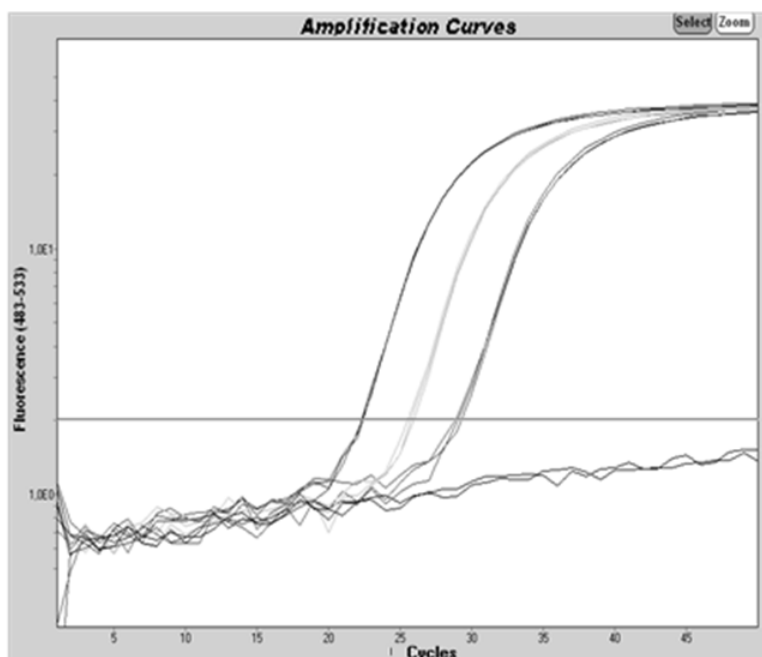


Figure 9. Détection des standards ABL (C1, C2, C3). 10³, 10⁴, et 10⁵ copies/5 μl.

Résultats

Courbe standard et critères de qualité

Les données brutes peuvent être copiées et collées dans un fichier Excel® à des fins d'analyse.

Pour chaque gène (ABL et BCR-ABL), les valeurs brutes de C_T obtenues à partir des dilutions plasmidiques standard sont représentées sur un graphe en fonction du nombre de copies log (3, 4, et 5 pour C1, C2, et C3 ; 1, 2, 3, 5, et 6 for F1, F2, F3, F4, et F5). La figure 10 montre un exemple de courbe théorique calculée sur 5 dilutions standard.

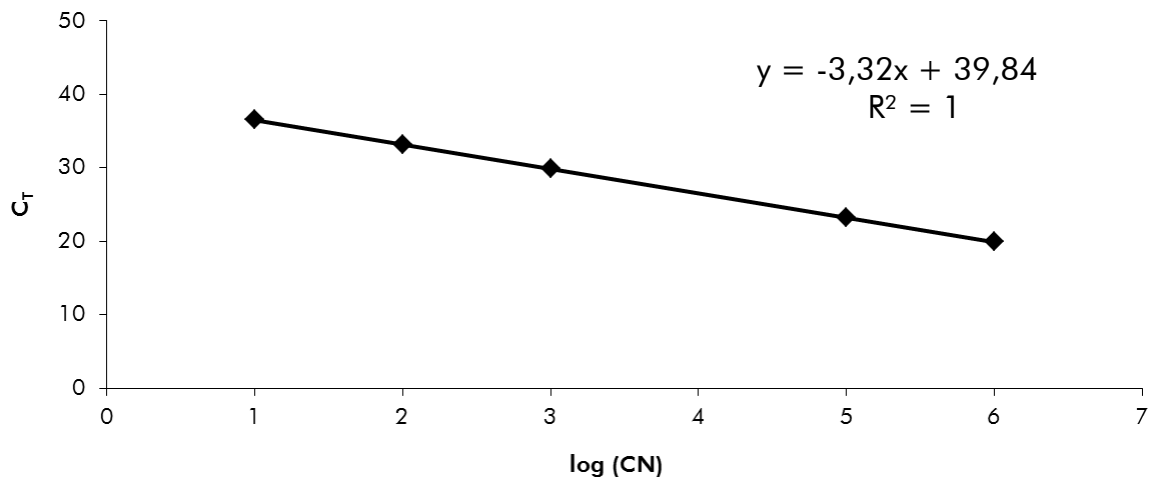


Figure 10. Courbe théorique calculée d'après 5 dilutions standard. Une courbe de régression linéaire ($y = ax + b$) est calculée pour chaque gène (ABL et BCR-ABL), où a représente la pente de la courbe et b le point d'intersection avec l'axe des ordonnées y . Son équation et son coefficient de détermination (R^2) figurent sur le graphique.

Les standards étant des dilutions au dixième, la pente théorique de la courbe est de $-3,3$. Une pente comprise entre $-3,0$ et $-3,9$ est acceptable tant que R^2 est $> 0,95$ (7). Toutefois, une valeur de détermination $R^2 > 0,98$ est souhaitable pour obtenir des résultats précis (3).

Nombre de copies normalisé (NCN)

Il convient d'utiliser l'équation de la courbe standard ABL pour convertir les valeurs brutes C_T associées aux échantillons inconnus (obtenues à l'aide du mélange PPC-ABL) en nombre de copies du gène ABL (ABL_{CN}).

Il convient d'utiliser l'équation de la courbe standard BCR-ABL pour convertir les valeurs brutes C_T associées aux échantillons inconnus (obtenues à l'aide du mélange PPF-Mbcr) en nombre de copies du gène BCR-ABL ($BCR-ABL_{Mbcrcn}$).

Le ratio de ces deux valeurs CN permet d'obtenir le nombre de copies normalisé (NCN) :

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

Valeur MRI

La valeur de la maladie résiduelle imperceptible (MRI) correspond au ratio entre l'expression du FG normalisée par rapport au CG au cours du suivi (FG_{NC}/CG_{NC}_{FUP}) et les échantillons diagnostiques (FG_{NC}/CG_{NC}_{DX}).

$$\text{Valeur MRI (MRIv)} = \frac{(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}}{(FG_{NC}/CG_{NC})_{DX}}$$

Sensibilité

La sensibilité (SENS_v) est calculée en fonction de l'expression relative du FG au moment du diagnostic (FG_{CN}/CG_{CN})_{DX} et de l'expression du CG (CG_{CN,FUP}) dans l'échantillon de suivi.

$$\text{Sensibilité (SENS}_v) = \frac{CG_{CN,DX}}{CG_{CN,FUP} \times FG_{CN,DX}}$$

Contrôle qualité des valeurs ABL

La qualité insuffisante de l'ARN ou la survenue de problèmes lors des différentes étapes de la qPCR induit une faible valeur ABL_{CN}. Il est recommandé de supprimer les résultats des échantillons qui génèrent une valeur ABL_{CN} < 4246,2 (valeur inférieure à l'IC de 95 % associé aux échantillons patients atteints de LMC dans l'étude EAC, référence 8).

Reproductibilité entre les réplicats

La variation des valeurs C_T entre les réplicats doit être < 2, ce qui correspond à une multiplication par 4 du nombre de copies.

La variation des valeurs C_T entre les réplicats est généralement < 1,5 si la valeur C_T des réplicats est < 36 (7).

Remarque : chaque technicien doit mesurer sa propre reproductibilité dans son laboratoire.

Contrôles H₂O

Les témoins négatifs doivent donner une valeur CN égale à zéro.

Un résultat H₂O positif découle d'une contamination croisée. Voir la section « Guide de résolution des problèmes » ci-dessous pour résoudre le problème.

Guide de résolution des problèmes

Ce guide de résolution des principaux problèmes rencontrés peut aider à répondre à certaines questions qui peuvent se poser. Pour plus d'informations, voir aussi la page Foire aux Questions de notre Centre d'assistance technique : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques des Services techniques de QIAGEN seront ravis de répondre à toutes les questions sur les informations et protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et d'analyses (pour les coordonnées, voir la section « Coordonnées », page 51).

Commentaires et suggestions

Résultat négatif pour le gène contrôle (ABL) et BCR-ABL MbcR dans tous les échantillons - Standard OK

- | | |
|--|--|
| a) Qualité insuffisante de l'ARN | Toujours vérifier la qualité et la concentration de l'ARN avant de commencer.

Tester un témoin ARN de lignée cellulaire positif (<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR Controls Kit, réf. 670191) en parallèle. |
| b) Échec de l'étape de transcription inverse | Toujours vérifier la qualité et la concentration de l'ARN avant de commencer.

Tester un témoin ARN de lignée cellulaire positif (<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR Controls Kit, réf. 670191) en parallèle. |

Résultat négatif pour le gène contrôle (ABL) dans les échantillons - Standard OK

- | | |
|--|--|
| a) Qualité insuffisante de l'ARN | Toujours vérifier la qualité et la concentration de l'ARN avant de commencer.

Tester un témoin ARN de lignée cellulaire positif (<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR Controls Kit, réf. 670191) en parallèle. |
| b) Échec de l'étape de transcription inverse | Toujours vérifier la qualité et la concentration de l'ARN avant de commencer.

Tester un témoin ARN de lignée cellulaire positif (<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR Controls Kit, réf. 670191) en parallèle. |

Commentaires et suggestions

Signal standard négatif

- a) Erreur de pipetage Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.
Répéter l'analyse PCR.
- b) Conditions de stockage inappropriées pour les composants du kit Conserver le kit *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR entre -15 et -30 °C et garder les mélanges sonde et amorces (PPC et PPF) à l'abri de la lumière. Voir « Conservation et manipulation des réactifs », page 14.
Éviter la congélation et la décongélation répétées.
Aliquoter les réactifs pour les stocker.

Les contrôles négatifs sont positifs

- Contamination croisée Remplacer tous les réactifs critiques.
Recommencer l'expérience avec de nouvelles aliquotes de tous les réactifs.
Toujours manipuler les échantillons, les composants du kit et les consommables conformément aux pratiques communément admises pour prévenir les contaminations croisées.

Aucun signal, même avec les témoins standard

- a) Erreur de pipetage ou réactifs omis Vérifier le schéma de pipetage et la préparation de la réaction.
Répéter l'analyse PCR.
- b) Effets inhibiteurs du matériel de l'échantillon dus à une purification insuffisante Recommencer la préparation de l'ARN.
- c) LightCycler : le canal de détection choisi est incorrect Définir le canal sur F1/F2 ou 530 nm/640 nm.

Commentaires et suggestions

- d) LightCycler : pas d'acquisition des données programmée
- Vérifier la programmation des cycles.
Sélectionner le mode d'acquisition « Single » (simple) à la fin de chaque phase d'hybridation de la PCR.

Signal nul ou de faible intensité avec les échantillons mais témoins standard OK

- a) Qualité insuffisante ou faible concentration de l'ARN
- Toujours vérifier la qualité et la concentration de l'ARN avant de commencer.
Tester un témoin ARN de lignée cellulaire positif (*ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Control Kit, réf. 670191) en parallèle.
- b) Échec de l'étape de transcription inverse
- Toujours vérifier la qualité et la concentration de l'ARN avant de commencer.
Tester un témoin ARN de lignée cellulaire positif (*ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Control Kit, réf. 670191) en parallèle.

L'intensité de fluorescence est trop faible

- a) Conditions de stockage inappropriées pour les composants du kit
- Conserver le kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc entre –15 et –30 °C et garder les mélanges sonde et amorces (PPC et PPF) à l'abri de la lumière. Voir « Conservation et manipulation des réactifs », page 14.
Éviter la congélation et la décongélation répétées.
Aliquoter les réactifs pour les stocker.
- b) Quantité initiale très faible d'ARN cible
- Augmenter la quantité d'échantillon d'ARN.
Remarque : selon la méthode de préparation de l'ARN choisie, des effets inhibiteurs peuvent survenir

LightCycler : l'intensité de fluorescence varie

- a) Erreur de pipetage
- La variabilité, liée à ce que l'on appelle des « erreurs de pipetage », peut être réduite en analysant les données en mode F1/F2 ou 530 nm/640 nm.

Commentaires et suggestions

- | | |
|--|---|
| b) Centrifugation insuffisante des capillaires | Le mélange de PCR préparé se trouve peut-être toujours dans le vaisseau supérieur du capillaire ou une bulle d'air est coincée à l'extrémité du capillaire.

Toujours centrifuger les capillaires chargés avec le mélange de réaction tel que décrit dans le guide de fonctionnement de l'appareil. |
| c) La surface extérieure de l'extrémité du capillaire est sale | Toujours porter des gants durant la manipulation des capillaires. |

LightCycler : erreur de la courbe standard

- | | |
|--------------------|--|
| Erreur de pipetage | La variabilité, liée à ce que l'on appelle des « erreurs de pipetage », peut être réduite en analysant les données en mode F1/F2 ou 530 nm/640 nm. |
|--------------------|--|

Contrôle qualité

Le contrôle qualité du kit complet a été réalisé sur un LightCycler® 480. Ce kit a été fabriqué conformément à la norme ISO 13485:2003. Les certificats de l'analyse sont disponibles, sur demande, sur www.qiagen.com/support/.

Limites

Les utilisateurs devront avoir été formés à cette technologie et la maîtriser avant d'utiliser ce dispositif.

Tous les résultats diagnostiques générés doivent être interprétés par rapport à d'autres résultats cliniques ou de laboratoire. Il incombe aux utilisateurs de valider la performance du système pour toutes les procédures utilisées dans leur laboratoire non couvertes par les études de performance QIAGEN.

Il convient de porter une attention particulière aux dates limite d'utilisation imprimées sur la boîte et les étiquettes de tous les composants. Ne pas utiliser de composants ayant expiré.

Remarque : ce kit a été conçu d'après les études « Europe Against Cancer » (EAC) (8, 5) et est conforme aux dernières recommandations internationales (3, 5). Il doit être utilisé selon les instructions données dans ce manuel, avec des réactifs et des appareils validés (voir « Matériel nécessaire mais non fourni », page 12). Toute utilisation non conforme avec les informations portées sur l'étiquetage ou la notice de ce produit, et/ou modification quelconque de l'un de ses composants décharge QIAGEN de toute responsabilité.

Caractéristiques de performance

Études non cliniques

Matériels et méthodes

Une évaluation des performances de ce kit a été réalisée sur un séquenceur ABI PRISM 7700 SDS, avec les réactifs répertoriés dans la section « Matériel nécessaire mais non fourni », page 12. Des études d'équivalence ont validé son utilisation sur les appareils suivants : ABI PRISM 7000 et 7900HT SDS, LightCycler 1.2 et 480, Rotor

Des études non cliniques ont été conduites afin de déterminer les performances analytiques du kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc. Ces études en laboratoire ont été menées sur de l'ARN total de lignée cellulaire K562 dilué dans de l'ARN total de lignée cellulaire MV4-11 afin d'obtenir un volume final constant.

En vue de déterminer la répétabilité du test, 5 concentrations différentes d'ARN total K562 (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg et 0,5 pg) diluées dans de l'ARN total MV4-11, afin d'obtenir un volume total final constant de 200 ng, ont été analysées sur 5 réplicats par analyse et lors de 4 analyses distinctes (figure 11).

- K562 $2,5 \times 10^{-2}$
- ▣ K562 $2,5 \times 10^{-3}$
- K562 $2,5 \times 10^{-4}$
- K562 $2,5 \times 10^{-5}$
- K562 $2,5 \times 10^{-6}$

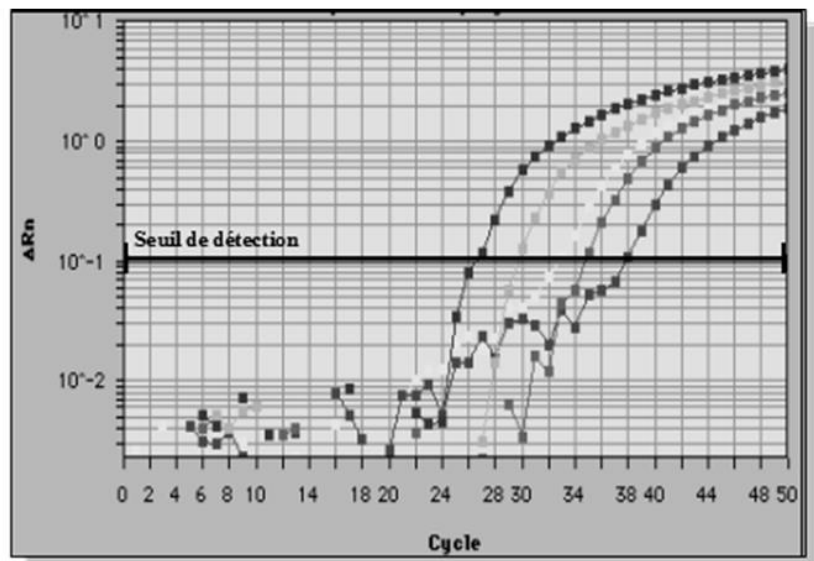


Figure 11. Tracés d'amplification correspondant à des dilutions de $2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng), $2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng), $2,5 \times 10^{-5}$ (0,005 ng) et $2,5 \times 10^{-6}$ (0,0005 ng) d'ARN total K562 dans de l'ARN total MV4-11 négatif.

Données analytiques

Les tableaux 17 à 20 présentent les analyses inter-essais avec la valeur moyenne de cycle de seuil (threshold cycle) (C_T), l'écart type (ET), le nombre d'échantillons (n), le coefficient de variation (CV), le nombre moyen de copies (CN) et le nombre de copies normalisé (NCN).

Tableau 17. Analyses inter-essais — Lignées cellulaires BCR-ABL Mbcr et ABL

Lignée cellulaire	Dilution	C _T moyen :	ET	n	CV (%)
BCR-ABL Mbcr	2,5 x 10 ⁻² (5 ng/200 ng)	26,18	0,40	20	1,54
	2,5 x 10 ⁻³ (0,5 ng/200 ng)	29,32	0,53	19	1,82
	2,5 x 10 ⁻⁴ (0,05 ng/200 ng)	32,62	0,62	20	1,91
ABL	–	23,59	0,20	95	0,83

Tableau 18. Analyse inter-essais – Plasmides

Gène	Plasmide	C _T moyen :	ET	n	CV (%)
BCR-ABL Mbcr	F1 (10 ¹ copies)	34,47	1,25	8	3,64
	F2 (10 ² copies)	31,48	0,54	8	1,71
	F3 (10 ³ copies)	28,17	1,11	7	3,95
	F4 (10 ⁵ copies)	21,20	0,65	8	3,06
	F5 (10 ⁶ copies)	18,22	0,09	6	0,49
ABL	C1 (10 ³ copies)	28,47	0,34	8	1,18
	C2 (10 ⁴ copies)	25,25	0,31	8	1,22
	C3 (10 ⁵ copies)	21,92	0,70	8	3,19

Tableau 19. Analyses inter-essais — Lignées cellulaires BCR-ABL Mbc r et ABL (CN moyen)

Lignée cellulaire	Dilution	CN moyen	ET	n	CV (%)
BCR-ABL Mbc r	$2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng/200 ng)	4 134,27	2 512,40	20	60,77
	$2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng/200 ng)	512,8	479,51	19	93,51
	$2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng/200 ng)	42,94	22,05	20	51,36
ABL	–	33 831,51	13 637,7	94	40,31

Tableau 20. Analyse inter-essais – Lignée cellulaire BCR-ABL Mbc r (NCN moyen)

Lignée cellulaire	Dilution	NCN* moyen	ET	n	CV (%)
BCR-ABL Mbc r	$2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng/200 ng)	12,6338	532,79	20	42,17
	$2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng/200 ng)	1,1605	94,69	19	81,61
	$2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng/200 ng)	0,1782	10,73	20	60,23

* Pour ces résultats d'études uniquement, le NCN est calculé comme suit :

$$\frac{M_{bc r_{CN}}}{ABL_{CN}} \times 100$$

Études cliniques

Une évaluation des performances de ce kit a été réalisée sur un séquenceur ABI PRISM 7700 SDS, avec les réactifs répertoriés dans la section « Matériel nécessaire mais non fourni », page 12. Des études d'équivalence ont validé son utilisation sur les appareils suivants : ABI PRISM 7000 et 7900HT SDS, LightCycler 1.2 et 480, Rotor

Vingt-six laboratoires, répartis dans 10 pays européens, réunis dans le cadre d'une action concertée pour l'EAC, ont utilisé des plasmides fournis par IPSOGEN afin de définir un protocole standardisé pour l'analyse qPCR des principaux gènes de fusion associés à la leucémie en contexte clinique. Le transcrit du BCR-ABL p210 figurait parmi les gènes de fusion (FG) inclus dans

cette étude. Les données présentées ici sont une synthèse de l'étude de validation ; les résultats complets ont été publiés (8, 10).

Reproductibilité inter-laboratoires des standards plasmidiques pour le CG et le FG

Au total, onze laboratoires ont mené une expérience de reproductibilité inter-laboratoires en vue d'évaluer la variabilité de la mesure des dilutions plasmidiques standard pour le CG et le FG. Ces dilutions ont été réalisées en double dans chaque établissement. Le tableau 21 présente la moyenne, l'écart type et le CV (%) associés à chaque dilution.

Tableau 21. Reproductibilité inter-laboratoires des standards plasmidiques pour le CG et le FG

Gène	Dilution	Moyenne	ET C_T	CV (%)
Gène contrôle ABL	C1	29,59	1,34	4,54
	C2	26,33	1,02	3,90
	C3	22,75	1,59	6,97
Gène de fusion BCR-ABL p210	F1	41,11	2,26	5,50
	F2	37,43	1,51	4,04
	F3	33,76	1,28	3,81
	F4	26,50	1,03	3,90
	F5	22,98	0,97	4,21

Valeurs d'expression du transcrit du gène de fusion BCR-ABL Mbc

Les tableaux 22 et 23 présentent les valeurs d'expression du transcrit du gène de fusion BCR-ABL Mbc et du gène contrôle ABL, pour la lignée cellulaire K562, chez les patients atteints de LAL (valeur au moment du diagnostic) et chez les patients sains.

Tableau 22. Valeurs d'expression du transcrite du gène de fusion BCR-ABL Mbc_r et du gène contrôle ABL – Valeurs C_T

	Valeurs C _T (plage à 95 %)	
	BCR-ABL Mbc _r	ABL
Lignée cellulaire K562	20,5	20,7
Échantillons prélevés chez des patients atteints de LMC		
MO (n = 15)	25,1 (21,5–27,0)	25,2 (20,7–26,8)
SP (n = 14)	23,1 (21,9–25,8)	23,7 (22,6–26,7)
Échantillons prélevés sur des patients atteints de LAL		
MO et SP (n = 17)	24,1 (21,5–29,9)	24,0 (21,6–26,4)
Échantillons prélevés sur des patients négatifs		
MO (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
SP (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

Tableau 23. Valeurs d'expression du transcrite du gène de fusion BCR-ABL Mbc_r et du gène contrôle ABL – CN et ratios

	Valeurs CN (plage à 95 %)		Ratios (plage à 95 %)*
	BCR-ABL Mbc _r	ABL	CN BCR-ABL Mbc _r /CN ABL
Échantillons prélevés chez des patients atteints de LMC			
MO (n = 15)	8 710 (2 089– 112 202)	10 115,8 (4 786,3– 37 153,52)	0,86 (0,44–3,02)
SP (n = 14)	17 783 (2 042– 112 202)	15 237 (4 246,2–25 568,3)	1,17 (0,48–4,41)
Échantillons prélevés sur des patients négatifs			
MO (n = 26)	–	19 201 (12 922–25 480)	–
SP (n = 74)	–	21 136 (17 834–24 437)	–

* Les résultats sont exprimés sous forme de ratios BCR-ABL/ABL simples.

Les valeurs C_T associées à ABL ne présentent pas de différences significatives entre les échantillons sains et leucémiques, ni entre les types d'échantillons (SP et MO) ou les types de leucémies (LAL, LAM ou LMC).

Taux de résultats faux positifs et faux négatifs

Les taux de faux négatifs et de faux positifs ont été calculés au moyen des témoins suivants :

- Témoins positifs : Cellules K562, lignée cellulaire bien connue pour exprimer le gène de fusion BCR
- Témoins négatifs : échantillons d'ARN négatif, témoins sans amplification (*no amplification controls* - NAC) constitués d'ARN d'*E. coli* au lieu d'ARN humain afin de vérifier l'absence de contamination par des produits de PCR, et témoins sans matrice (*no template controls* - NTC) qui contiennent de l'eau à la place de l'ARN humain.

L'amplification du FG sur les échantillons d'ARN a été réalisée en triple et celle du CG en double.

Il a été défini qu'un échantillon faux négatif correspond à un échantillon d'ARN positif présentant moins de 50 % de puits positifs (0/2, 0/3 ou 1/3).

Il a été défini qu'un échantillon faux positif correspond à un échantillon négatif présentant moins de 50 % de puits positifs (1/2, 2/3 ou 3/3).

Le tableau 24 présente le nombre et le pourcentage d'échantillons faux négatifs et faux positifs.

Tableau 24. Échantillons faux négatifs et faux positifs

Faux négatifs		Faux positifs	
10^{-3}	10^{-4}	Témoin négatif pour le FG	NAC/NTC
0 % (0/33)	6,1 % (2/33)	10,9 % (6/55)	4,1 % (14/340)

Bibliographie

QIAGEN tient à jour une vaste banque de données en ligne de publications scientifiques mentionnant les produits QIAGEN. Des critères de recherche permettent de trouver les articles à l'aide d'un mot-clé ou en spécifiant l'application, le domaine de recherche, le titre, etc.

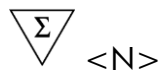









Pour une bibliographie complète, visitez la Base de données bibliographique QIAGEN en ligne à l'adresse www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou bien contactez les Services techniques de QIAGEN ou votre distributeur local.

Références citées

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. Silvy, M., Mancini, J., Thirion, X., Sigaux, F., and Gabert, J. (2005) Evaluation of real-time quantitative PCR machines for the monitoring of fusion gene transcripts using the Europe against cancer protocol. *Leukemia* **19**, 305.
10. 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.

Symboles

Les symboles suivants peuvent figurer sur l’emballage et les étiquettes :

	Contient suffisamment de réactifs pour <N> réactions
	À utiliser avant
	Matériel médical destiné au diagnostic <i>in vitro</i>
	Référence du catalogue
	Numéro de lot
	Référence du matériel
	Code article international (GTIN)
	Limite de température
	Fabricant
	Lire le mode d’emploi

Coordonnées

Pour une assistance technique et plus d’informations, consulter notre Centre d’assistance technique à www.qiagen.com/Support, appeler le 00800-22-44-6000 ou contacter l’un des Départements du service technique de QIAGEN ou des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Pour commander

Produit	Contenu	Référence
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Kit (24)	Pour 24 réactions : standards pour le gène contrôle ABL, standards pour le gène de fusion BCR-ABL Mbc, mélange sonde et amorces pour ABL, mélange sonde et amorce pour le gène de fusion BCR-ABL Mbc	670123
Rotor-Gene Q MDx — Pour analyse PCR en temps réel validée pour le diagnostic <i>in vitro</i> dans le cadre d'applications cliniques		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cycleur thermique en temps réel et analyseur de fonte de haute résolution avec 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge et pourpre) et canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre ; installation et formation non comprises	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cycleur thermique en temps réel et analyseur de fonte de haute résolution avec 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge et pourpre) et canal HRM, ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main-d'œuvre ; installation et formation comprises	9002033
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls Kit (Kit de témoins <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc) — Pour la validation qualitative des extractions d'ARN et la transcription inverse du gène de fusion BCR-ABL1 Mbc		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls Kit	Lignées cellulaires caractérisées par une expression négative, élevée et faiblement positive du gène de fusion BCR-ABL Mbc.	670191

Pour obtenir les dernières informations sur la licence et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN respectif. Les manuels des kits et manuels d'utilisation

QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être sollicités auprès des Services techniques QIAGEN ou du distributeur local.

Page laissée volontairement vierge

Page laissée volontairement vierge

Ce produit est destiné à être utilisé dans le cadre de diagnostics *in vitro*. Les produits *ipsogen* ne peuvent être revendus, modifiés pour la revente, ou utilisés pour fabriquer d'autres produits commerciaux sans l'autorisation écrite de QIAGEN.

Les informations contenues dans ce document peuvent être modifiées sans préavis. QIAGEN n'assume aucune responsabilité quant aux erreurs qui pourraient apparaître dans ce document. Ce document est considéré comme complet et exact au moment de sa publication. QIAGEN ne pourra en aucun cas être tenue responsable de dommages accessoires, particuliers, multiples ou consécutifs en relation avec, ou découlant de, l'utilisation de ce document.

Les spécifications présentées par les produits *ipsogen* sont garanties. La seule obligation de QIAGEN ainsi que le seul recours de tout client sont limités au remplacement sans frais des produits dans le cas où ces derniers ne correspondent pas aux performances garanties.

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

Accord de licence limitée

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc acceptes les conditions suivantes :

1. Le kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc ne doit être utilisé que conformément au *Manuel du Kit ipsogen BCR-ABL1 Mbc* et avec les composants fournis à l'intérieur du kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans le *Manuel du Kit BCR-ABL1 Mbc ipsogen* et autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com.
2. Hormis les licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son(s) utilisation(s) ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les termes précédents. QIAGEN peut faire appliquer des interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour les termes de licence mis à jour, voir www.qiagen.com.

HB-1360-002 © 2013–2015 QIAGEN, tous droits réservés.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

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

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

