

“SensiQuant MASTER MIX”

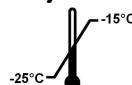
SensiQuant P210 MasterMix

Detekce a měření mRNA BCR/ABL varianta P210

(Transkript Mbcr)

REF SQT-027

CE



Obsah

Použití	Str. 1
Popis výrobku	Str. 2
Technologická specifikace	Str. 2
Reagencie dodávané	Str. 2
Další vybavení/ potřebné reagentů	Str. 2
Varování a upozornění	Str. 3
Vzorky a kontroly	Str. 5
Návod k použití	Str. 6
Informace k postupu	Str. 10
Řešení problémů	Str. 11
Odkazy a symboly	Str. 13
Pracovní list	Str. 14

K provedení KVANTITATIVNÍ analýzy musí být souprava „SensiQuant 210 MasterMix“ používána výhradně ve spojení s produktem „SensiQuant P210 Standard“.

K provedení KVALITATIVNÍ analýzy může být souprava „SensiQuant 210 MasterMix“ použita ve spojení s jedním ze čtyř ředících bodů soupravy „SensiQuant P210 Standard“ jako pozitivní kontrola.

Produkt by měl být používán podle pokynů uvedených v této příručce v kombinaci s validovanými přístroji a reagenty. Jakékoli použití tohoto produktu off-label a/nebo modifikace složek ruší odpovědnosti výrobce Bioclarma.

Použití

“SensiQuant 210 MasterMix“ je in vitro zdravotnický prostředek pro:

- pro detekci transkriptu BCR/ABL P210 (BCR-ABL P210, Mbcr) v celkové RNA extrahované ze vzorků periferní krve nebo kostní dřeně.
 - pro kvantifikaci transkriptu BCR/ABL P210 (BCR-ABL P210, Mbcr) normalizovaného pomocí počtu transkriptů kontrolního genu (ABL) v celkové RNA extrahované ze vzorků periferní krve nebo kostní dřeně.
- Produkt byl navržen pro kvantitativní analýzu případů chronické myeloidní leukémie (CML), akutní myeloidní leukémie (AML) a akutní lymfoblastické leukémie (ALL), pro doplnění klinických údajů a dalších laboratorních testů. Kromě toho výsledky získané tímto testem slouží ke sledování účinnosti terapií a sledování minimálního rezidua nemoci (MRD).

POZNÁMKA: Souprava „SensiQuant 210 MasterMix“ byla navržena podle studií „Evropa proti rakovině“ (Gabert et al., Leukemia 2003) a je v souladu s aktualizovanými mezinárodními doporučeními (Branford et al., Leukemia 2006; Hugues et al., Blood 2006).

PRACOVNÍ POSTUP

Výrobek „SensiQuant 210 MasterMix“ je založen na technologii One-Step RT-PCR, která umožňuje vysoce reprodukovatelnou syntézu prvního řetězce cDNA a kontinuální Real Time PCR v jedné zkumavce. Na základě toho umožňuje sada „SensiQuant 210 MasterMix“ maximální efektivitu RT-PCR, citlivost a specifitu a zároveň minimalizuje čas a náklady na analýzu.

Výrobek „SensiQuant 210 MasterMix“ obsahuje:

- ➊ SensiQuant P210 Master Mix BCR/ABL: reakční směs pro amplifikaci translokačního genu BCR/ABL, P210 v reálném čase připravenou k použití. Kombinace obsahuje: reakční pufr, ionty hořčíku, dNTP, Taq polymerázu, primery a sondu specifickou pro P210.
- ➋ SensiQuant P210 Master Mix ABL: reakční směs pro amplifikaci housekeeping genu ABL v reálném čase připravenou k použití. Kombinace obsahuje: reakční pufr, ionty hořčíku, dNTP, Taq polymerázu, primery a sondu specifickou pro ABL.
- ➌ SensiQuant RT: optimalizovaný a připravený roztok MMLV Reverse Transkriptázy. Toto činidlo bylo optimalizováno pro práci s jedнокrokovým protokolem, ve kterém je syntéza cDNA prvního řetězce a následná Real Time PCR prováděna v jedné zkumavce.

Pro každý vzorek test obsahuje:

- duplicitní Real Time amplifikaci pro cílový gen BCR/ABL;
- duplicitní Real Time amplifikaci pro housekeeping gen ABL.

Čtyři reakce se provádějí na mikrodestičce s programovatelným zahříváním vybaveným optickým fluorescenčním detekčním systémem (Real Time Termocykler).

Test využívá principu dvojího barvení RQ-PCR hydrolyzy oligonukleotidů. Specifická sonda (označená FAM jako reportér a TAMRA jako zhášec) se váže k amplikonu během každého kroku annealinky v PCR. Když Taq prodlužuje řetězec od primeru navázaného na amplikon, přemístí 5'-konec sondy, který je pak degradován 5'-3' exonukleázovou aktivitou Taq polymerázy. Štěpení pokračuje, dokud se zbývající sonda neuvolní z amplikonu. Tento proces uvolňuje fluorofor a zhášec do roztoku, prostorově je odděluje a vede ke zvýšení fluorescence od FAM a ke snížení TAMRA.

Zpracování získaných dat určuje přítomnost a titr cDNA BCR/ABL P210 ve výchozím vzorku ve srovnání s referenční ABL cDNA.

Validace byla prováděna na přístrojích:

- Bio-Rad Instruments: CFX96, CFX Connect

TECHNOLOGICKÁ SPECIFIKACE

- Applied Biosystems Instruments: 7300, 7500, 7900, StepOne Plus.

Výrobek SensiQuant 210 MasterMix se smí používat pouze v kombinaci se soupravou SensiQuant 210 Standard.

Výrobek umožňuje 24 duplicitních stanovení pro mRNA P210 a 24 duplicitních stanovení pro mRNA ABL, včetně standardů a kontrol (např. 19 pacientů v jednom běhu) o celkovém objemu 25 µl.

Pozn. Další běhy mohou vést k vyčerpání některých činidel. S ohledem na chyby pipetování jsou reagenty jsou dodávány v nadbytku.

Citlivost testu: Test umožňuje odhalit přítomnost přibližně 5 cílových molekul DNA v 5 µl vzorku přidaného k amplifikační reakci.

Lineární rozsah měření umožňuje stanovení titru v rozmezí 1 000 000 až 10 cílových kopií v 5 µl vzorku přidaného k amplifikační reakci.

DODÁVANÉ REAGENCIE

	REAGENT	QUANTITY	COMPOSITION
	SensiQuant P210 Master Mix ABL	2 x 500 µl	ready to use mixture for the detection of ABL
	SensiQuant P210 Master Mix BCR/ABL	2 x 500 µl	ready to use mixture for the detection of BCR/ABL
	SensiQuant RT	1 x 35 µl	stabilized and ready to use solution of MMLV Reverse Transcriptase
	Ultrapure water	1 x 500 µl	ultrapure water for molecular biology

DALŠÍ POTŘEBNÉ VYBAVENÍ

- ➊ Laminární box. J
- ➋ jednorázové latexové rukavice bez pudru nebo podobné
- ➌ Vortex mixér.
- ➍ Mikrocentrifuga (12 000/14 000 RPM).
- ➎ Sterilní mikropipety a špičky s aerosolovým filtrem nebo podobné (0,5-10 µl, 2-20 µl, 5-50 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl).
- ➏ Přílnavé uzavírání pro mikrotitrační destičky bez RNázy a DNázy.
- ➐ Real-Time PCR přístroj.

DALŠÍ POTŘEBNÉ VÝROBKY

Standardy DNA o známé koncentraci nejsou součástí této soupravy. K provedení těchto analytických kroků se doporučují následující doplňkové produkty vyrobené společností Bioclarma:

- 3 **SensiQuant P210 Standard (cod. STD-027):**
Plazmidová DNA o známé koncentraci pro získání kalibračních křivek pro P210 a ABL.

Pro sladění s mezinárodními standardy (IS) se doporučují následující doplňkové produkty vyrobené společností Bioclarma:

- 3 **PHILARef (kód. SRF-027):** čtyři zkumavky celkové RNA extrahované ze dvou směsí lidských buněčných linií v různých poměrech. Každý roztok byl získán zředěním známého množství buněk pozitivních na translokaci t (9; 22), BCR-ABL přesmyk, varianta P210, ve známých množstvích buněk, které tuto translokaci nemají.

VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ

Tento výrobek je určen výhradně pro použití in vitro.

Reagencie a pokyny dodávané v této soupravě byly validovány pro optimální provedení. Další ředění činidel nebo změna inkubačních teplot může vést k chybným nebo nesouhlasným údajům. Rozdíly ve zpracování vzorků a technických postupech v uživatelské laboratoři mohou způsobit neplatnost výsledků testu.

Všechny reagencie soupravy jsou speciálně formulovány pro použití v kombinaci s produktem **SensiQuant P210 Standard (kat.č. STD-027)** Bioclarma., Abyste zajistili optimální provedení testu, nedoporučujeme míchání s výrobkem jiného výrobce.

Zvláštní upozornění pro manipulaci:

Postupy molekulární biologie, jako je extrakce, reverzní transkripce, amplifikace a detekce nukleových kyselin, vyžadují kvalifikovaný personál, aby se předešlo riziku chybných výsledků.

Extrémní opatrnosti předcházejte:

- 3 Kontaminaci RNázy/DNázy, které by mohly způsobit degradaci templátové mRNA a generované cDNA;
- 3 Kontaminaci přenášené mRNA nebo PCR vede k falešně pozitivnímu signálu.

Doporučujeme proto následující:

- Používejte oddělené oblasti pro extrakci/přípravu amplifikačních reakcí a pro amplifikaci/detekci

amplifikačních produktů. Nikdy nepřenášejte produkty amplifikace do oblasti určené pro extrakci/přípravu amplifikačních reakcí;

- Používejte laboratorní pláště, rukavice a nástroje, které se používají výhradně pro extrakci/přípravu amplifikačních reakcí a pro amplifikaci/detekci amplifikačních produktů. Nikdy nepřenášejte laboratorní pláště, rukavice nebo nástroje z oblasti určené pro amplifikaci/detekci produktů amplifikace do oblasti určené pro extrakci/přípravu.
- Se vzorky manipulujte v laminárním boxu. Vzorky musí být použity výhradně pro tento typ analýzy;
- Vyvarujte se současného otevírání zkumavek obsahujících různé vzorky.
- Pro všechny pipetovací kroky a pipety používejte nové špičky odolné vůči aerosolům. Použité špičky musí být sterilní, bez DNáz a RNáz, bez DNA a RNA. Pipety používané ke zpracování vzorků musí být použity výhradně pro tento konkrétní účel;
- S činidly manipulujte v laminárním boxu. Činidla nezbytná pro amplifikaci musí být připravena tak, aby mohla být použita v jedné sérii. Pipety používané k manipulaci s činidly musí být použity výhradně pro tento účel. Pipety musí být pozitivního výtlačku nebo musí být použity s hroty aerosolového filtru. Použité špičky musí být sterilní, bez DNáz a RNáz, bez DNA a RNA;
- Manipulujte s produkty amplifikace takovým způsobem, aby se co nejvíce omezilo rozptylování do prostředí, aby se zabránilo možné kontaminaci. Pipety používané k manipulaci s produkty amplifikace musí být použity výhradně pro tento konkrétní účel.

Varování a obecná bezpečnostní opatření:

S lidskými tkáněmi je třeba zacházet jako s potenciálně infekčními, a musí být likvidovány s náležitými preventivními opatřeními a v souladu s pokyny OSHA a/nebo CAP (nebo ekvivalentními EU).

- Vyvarujte se přímého kontaktu s biologickými vzorky. Vyvarujte se rozstříkávání nebo rozprašování. Materiály, které přicházejí do styku s biologickými vzorky, musí být před likvidací ošetřeny 3% chlornanem sodným po dobu nejméně 30 minut nebo autoklávovány při 121 ° C po dobu jedné hodiny;
- Zacházejte a likvidujte všechna činidla a všechny testovaný materiál, jako by byl potenciálně infekční. Vyvarujte se přímého kontaktu s reagenty. Vyvarujte se rozstříkávání nebo rozprašování. S odpadem je třeba zacházet a likvidovat v souladu s příslušnými bezpečnostními normami. Jednorázové hořlavé materiály musí být spáleny. Kapalný odpad obsahující kyseliny nebo zásady musí být před likvidací neutralizován;

- Používejte vhodný ochranný oděv a rukavice a chraňte oči/obličej. Další informace naleznete v bezpečnostním listu (MSDS).
- Nikdy pipetujte roztoky ústy a vyhýbejte se kontaktu s kůží a sliznicemi.
- Na pracovišti nejzte, nepijte, nekuřte ani neaplikujte kosmetické výrobky.
- Po manipulaci se vzorky a reagensy si důkladně umyjte ruce.
- Zbytková činidla a odpad zlikvidujte v souladu s platnými předpisy.
- Před spuštěním testu si přečtete všechny pokyny dodané s výrobkem.
- Při provádění testu postupujte podle pokynů dodaných s výrobkem.
- Nepoužívejte produkt po uplynutí doby použitelnosti.
- Používejte pouze činidla dodávaná v produktu a činidla doporučená výrobcem.
- Nemíchejte činidla z různých šarží.
- Nepoužívejte činidla z produktů jiných výrobců.

Varování a bezpečnostní opatření týkající se jednotlivých součástí:

Pro výrobek **SensiQuant P210 MasterMix** platí následující bezpečnostní pokyny (P):

P261. Vyvarujte se vdechnutí prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/spreje.

P262. Zabraňte vniknutí do očí, na kůži nebo na oděv

Skladování:

Součásti **SensiQuant RT** skladujte při -15 ° C až -25 ° C v mrazáku s konstantní teplotou.

Součásti **SensiQuant P210 MasterMix BCR/ABL** a **SensiQuant P210 MasterMix ABL** skladujte při -15 ° C až -25 ° C v mrazáku s konstantní teplotou až do prvního použití.

Vyvarujte se opakování cyklů zmrazování a rozmrazování, které mohou snížit kvalitu výrobku.

Minimalizujte vystavení různých složek soupravy světlu.

Všechny součásti soupravy uchovávejte v originálních obalech.

Před otevřením zkumavky jemně promíchejte a krátce odstředte.

Tyto podmínky skladování platí pro otevřené komponenty a dosud neotevřené. Reagencie skladované za jiných podmínek, než jaké jsou uvedeny na štítku, nemusí umožňovat správné provedení testu mohou negativně ovlivňovat výsledky.

Stabilita kitu:

Za správných skladovacích podmínek je souprava stabilní do data expirace vytištěného na štítku. Výrobek si zachová kvalitu do data expirace vytištěného na štítku.

VZORKY A KONTROLY

Vzorky:

Tento výrobek je navržen pro použití s RNA extrahovanou z:

- periferní krve odebrané v EDTA nebo citrátu,
- kostní dřeň odebrané do EDTA nebo citrátu,
- lymfo-monocytová nebo suspenze leukocytů.

K přípravě RNA se doporučují následující protokoly/činidla:

- Manuální postup (TRIzol Činidlo - Invitrogen, Purezol - Biorad a podobně)
- RNA extrakční souprava s kolonkami (RNeasy Mini Kit - Qiagen);
- Poloautomatický postup extrakce (Maxwell 16 - Promega).

Periferní krev a kostní dřeň odebraná do EDTA nebo citrátu.

Vzorky periferní krve a vzorky kostní dřeň musí být odebírány podle laboratorních pokynů, přepravovány při + 2 °/+ 8 ° C a skladovány při + 2 °/+ 8 ° C po dobu maximálně čtyř hodin. Pokud je výchozím materiálem periferní krev, je vhodné separovat lymfomonocyty na Ficoll™ podle laboratorních pokynů. Optimální množství leukocytů pro celkovou extrakci RNA je přibližně 10 000 000 buněk. Nezmrazujte periferní krev, aby nedošlo k degradaci RNA.

Lympho-monocyty nebo suspenze leukocytů

Lymfo-monocyty nebo leukocyty musí být připraveny podle laboratorních pokynů, resuspendovány ve sterilním izotonickém pufru a skladovány při + 2 °/+ 8 ° C po dobu maximálně čtyř hodin. Optimální množství lymfomonocytů a leukocytů pro celkovou extrakci RNA je přibližně 10 000 000 buněk. Nezmrazujte buněčnou suspenzi, aby nedošlo k degradaci RNA.

Interferující látky:

Celkový vzorek RNA nesmí obsahovat heparin, hemoglobin nebo Ficoll™, aby se zabránilo inhibičním účinkům na amplifikační reakci. Nejsou k dispozici žádné údaje týkající se možných inhibičních účinků antibiotik, antivirotik, chemoterapeutik nebo imunosupresiv.

Příprava RNA ze vzorků pacienta musí být provedena doporučeným postupem (TriZol, Invitrogen; PureZol, Bio-Rad). **Kvalita testu závisí do velké míry na kvalitě počáteční RNA.** Před následnou analýzou doporučujeme ověřit kvalitu vyčištěné RNA elektroforézou na agarózovém gelu nebo pomocí Agilent Bioanalyzer.

Koncentrace vzorku:

Pro každý vzorek test vyžaduje:

- retro-transkripční/amplifikační reakce pro transkript BCR/ABL (v duplikátu)
- retro-transkripční/amplifikační reakce pro ABL transkript (v duplikátu)

Množství RNA v reakci je:

1,5 µg celkové RNA na jamku: úplná analýza klinického vzorku vyžaduje 6 µg celkové RNA. Každý vzorek RNA se zředí na koncentraci 0,3 µg/µl tak, aby 5 µl obsahovalo 1,5 µg RNA.

NEBO

0,5 µg celkové RNA na jamku: úplná analýza klinického vzorku vyžaduje 2 µg celkové RNA. Každý vzorek RNA zředíte v koncentraci 0,1 µg/µl tak, aby 5 µl obsahovalo 0,5 µg RNA.

Doporučuje se připravit několik alikvotů vzorků, aby se zabránilo opakování cyklů zmrazování a rozmrazování, které mohou snížit kvalitu vzorku

Kontroly amplifikace:

Je naprosto povinné ověřit každou amplifikační relaci negativními a pozitivními kontrolními reakcemi. Jako negativní kontrolu použijte sterilní vodu bez nukleázy (dodává se s produktem, **Ultrapure Water**, zkumavka NEUTRAL Cap tube).

Jako pozitivní kontrolu použijte produkt „SensiQuant P210 Standard“ vyrobený společností Bioclarma nebo některou ze směsí dodávaných s výrobkem „PHILARef“.

NÁVOD K POUŽITÍ

Uživatel by si měl před použitím pečlivě přečíst tyto pokyny a seznámit se se všemi částmi.

Před zahájením běhu je důležité provést následující kroky:

- s odkazem na dokumentaci k přístroji ověřte, že termocykler v reálném čase je schopen excitovat použité fluorofory a měřit emitované světlo;
- s odkazem na dokumentaci k přístroji nastavte „detektor“ (měřená fluorescence) a typ reakce (vzorek, negativní kontrola, standardní kvantitativní DNA) pro každou jamku použitou v mikrodestičce. Přidejte tyto informace **do pracovního listu** přiloženého na konci tohoto dokumentu. Při pipetování reakční směsi a vzorků do jamek doporučujeme pečlivě sledovat **pracovní list**.

Poznámka: pro titraci cílové cDNA ve vzorcích nastavte dvě standardní křivky, jednu pro P210 a druhou pro ABL pomocí **SensiQuant P210 Standard** (10^5 - 10^4 - 10^3 - 10^2 kopií). Každý bod křivky je vytvořen alespoň jako duplikát.

Následuje příklad, jak lze uspořádat analýzu 3 vzorků.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P210 10 ⁵	C1 P210	ABL 10 ⁵	C1 ABL								
B	P210 10 ⁵	C1 P210	ABL 10 ⁵	C1 ABL								
C	P210 10 ⁴	C2 P210	ABL 10 ⁴	C2 ABL								
D	P210 10 ⁴	C2 P210	ABL 10 ⁴	C2 ABL								
E	P210 10 ³	C3 P210	ABL 10 ³	C3 ABL								
F	P210 10 ³	C3 P210	ABL 10 ³	C3 ABL								
G	P210 10 ²	CN P210	ABL 10 ²	CN ABL								
H	P210 10 ²	CN P210	ABL 10 ²	CN ABL								

P210 10⁵- P210 10²: Standard pro BCR/ABL P210; ABL 10⁵- ABL 10²: Standard pro ABL; NC: negativní kontrola, Vzorky C1-C3.

- Podle dokumentace k přístroji nastavte podmínky cyklování popsané níže, označující 50 cyklů a reakční objem 25 µl.

Bio-Rad CFX96 a CFX Connect Instruments:

Amplification thermal cycle		
Temperature	Timing	Phase
50°C	10 min.	cDNA synthesis
95°C	5 min.	RT enzyme inactivation
95°C	10 sec.	PCR cycling and detection (50 cycles)
60°C (*)	30 sec.	

(*) Fluorescence Signal Acquisition

Analysis mode: single threshold s volbou “baseline subtracted curve fit”.

Nastavení threshold value of 100;

Baseline Cycles: autocalculated.

Fluorescence: FAM.

Applied Biosystems Instruments (7300, 7500, 7900, Step One Plus):

Amplification thermal cycle		
Temperature	Timing	Phase
50°C	10 min.	cDNA synthesis
95°C	5 min.	RT enzyme inactivation
95°C	20 sec.	PCR cycling and detection (50 cycles)
60°C (*)	1 min.	

(*) Fluorescence Signal Acquisition

Acquisition mode: standard

Analysis mode: standard curve with absolute quantification;

Fluorescence: **FAM**;Quencher: **TAMRA**;Passive Reference: **ROX**

Doporučuje se nastavit threshold na 0.15 (0.1 pro Step-One Plus Instrument) Nastavit rozsah výpočtu baseline od cyklu 3 do cyklu 15.

Nastavení amplifikace:

Před zahájením běhu je důležité provést následující kroky:

Vyndejte a rozmrazte zkumavky obsahující analyzované vzorky. Jemně promíchejte a zkumavky odstředte, aby se obsah dostal na dno a udržujte na ledu.

Vyndejte a rozmrazte potřebnou **SensiQuant P210 MasterMix BCR/ABL (ŽLUTÁ kryt zkumavky)** a **SensiQuant P210 MasterMix ABL (BÍLÝ kryt zkumavky)**. Jemně promíchejte převrácením a zkumavky krátce odstředte, aby se obsah dostal na dno; udržujte na ledu; Vyndejte a položte na led zkumavku **SensiQuant RT (FIALOVÝ kryt zkumavky)** obsahující stabilizovaný enzym retro-transkriptázu;

Vyndejte a rozmrazte potřebné zkumavky **SensiQuant P210 STANDARD** pro standardní křivky BCR/ABL P210 a ABL. Jemně promíchejte a centrifugujte zkumavky po dobu 5 sekund, aby se obsah dostal na dno; udržujte na ledu;

- 1) Připravte si následující „směs P210“ obsahující **SensiQuant P210 MasterMix BCR/ABL a SensiQuant RT** podle počtu zpracovávaných vzorků:

P210 Pre-Mix	Cap Tube Colour	Vol. for 1 sample (µl)
SensiQuant P210 MasterMix BCR/ABL	YELLOW	19,7
SensiQuant RT	PURPLE	0,3
Total Volume		20

Promíchejte převrácením zkumavky a vyhněte se tvorbě pěny. Krátce odstředte (max. 5 sekund), aby se obsah dostal na dno a udržujte na ledu.

- 2) Připravte si následující „premix ABL“ obsahující **SensiQuant P210 MasterMix ABL a SensiQuant RT** podle počtu zpracovávaných vzorků:

ABL Pre-Mix	Cap Tube Colour	Vol. for 1 sample (µl)
SensiQuant P210 MasterMix ABL	WHITE	19,7
SensiQuant RT	PURPLE	0,3
Total Volume		20

Promíchejte převrácením zkumavky a vyhněte se tvorbě pěny. Krátce odstředte (max. 5 sekund), aby se obsah dostal na dno a udržujte na ledu.

- 3) Pipetujte 20 µl směsi „**P210 premixu**“ na dno jamek P210 amplifikační mikrotitrační destičky, podle **pracovního listu**
- 4) Pipetujte 20 µl směsi „**ABL pre-mixu**“ na dno jamek ABL amplifikační mikrotitrační destičky, podle **pracovního listu**
- 5) Opatrně přidejte 5 µl **ultračisté vody** (zkumavka s NEUTRÁLNÍM krytem) jako negativní kontrolu amplifikace do každé ze dvou jamek P210 a ABL amplifikační mikrodestičky, podle **pracovního listu**.
- 6) Opatrně přidejte 5 µl (odpovídající 1,5 µg nebo 0,5 µg/µl) prvního vzorku **RNA** do každé ze dvou jamek P210. Podobně pokračujte se zbývajících vzorky RNA, podle **pracovního listu**.
- 7) Opatrně přidejte 5 µl (odpovídající 1,5 µg nebo 0,5 µg/ul) prvního vzorku **RNA** do každé ze dvou jamek ABL. Podobně pokračujte se zbývajících vzorky RNA, podle **pracovního listu**.
- 8) Opatrně přidejte 5 µl kopií **SensiQuant STANDARD P210** 10² do dvou jamek P210 a do dvou jamek ABL amplifikační destičky podle **pracovního listu**. Stejně pokračujte s dalšími **SensiQuant P210 STANDARDy** (10³, 10⁴, 10⁵ kopií).
- 9) Amplifikační mikrotitrační destičku opatrně utěsněte pomocí amplifikační adhezivní fólie a krátce odstředte, aby se obsah dostal na dno jamek.
- 10) Umístěte mikrodestičku do termocyklu a spusťte definovaný program.

Interpretace testu:• **Obecná validace:**

Hodnoty fluorescence čtyř standardů získaných se specifickými sondami BCR/ABL P210 a ABL se používají pro výpočet **kalibračních křivek** amplifikačního běhu a pro validaci amplifikace a detekce reakcí.

Pro každou kalibrační křivku (ABL a BCR/ABL) se použije lineární regresní analýza ($y = ax + b$). Hodnota **a (slope-směrnice)** odpovídá sklonu linie a hodnota **b (konstanta)** odpovídá **y-interceptu**. Z dat je extrapolován **koeficient lineární korelace (R2)**, který definuje meze přijatelnosti pro standardní křivky, jak je popsáno v následující tabulce:

Linear correlation coefficient (R2)	Acceptability range	Amplification/ Detection
BCR/ABL P210	$0,990 \leq R2 \leq 1,000$	VALID
ABL Standard Curve	$0,990 \leq R2 \leq 1,000$	VALID

Pokud není hodnota R2 v uvedených mezích, došlo během amplifikační nebo detekční fáze k problému (nesprávná příprava reakční směsi, nesprávné dávkování reakční směsi nebo standardů, degradace sondy nebo standardu, nesprávné nastavení standardní polohy, nesprávné nastavení tepelného cyklu), což může způsobit nesprávné výsledky.

Výsledky běhu jsou neplatné a test se musí opakovat. Řešení najdete v Průvodci řešením problémů na konci dokumentu.

Hodnoty fluorescence získané pomocí specifických sond BCR/ABL P210 a ABL v amplifikačních reakcích **negativní kontroly** se používají k validaci amplifikačních a detekčních reakcí, jak je uvedeno v následující tabulce

Threshold Cycle of Negative Control (FAM)	Acceptability range	Amplification/ Detection
Undetermined	NEGATIVE	CORRECT

Pokud se výsledek amplifikační reakce negativní kontroly liší od „Ct neurčeno“, znamená to, že v amplifikační reakci byla detekována cílová DNA. Během fáze amplifikace se vyskytly problémy (kontaminace), které mohou způsobit nesprávné výsledky a falešně pozitivní výsledky. **Výsledky běhu jsou neplatné a test se musí opakovat. Řešení najdete v Průvodci řešením problémů na konci dokumentu.**

• **Identifikace BCR/ABL P210:**

Hodnoty fluorescence emitované specifickými sondami amplifikačních reakcí a **prahová hodnota fluorescence-threshold** se používají k detekci přítomnosti cílové DNA prostřednictvím stanovení prahového cyklu **threshold (Ct)**.

Poznámka: Pomocí softwarových nástrojů přístroje ověřte, že Ct je určeno rychlým a pravidelným zvyšováním hodnoty fluorescence, a nikoli izolovanými maximami nebo zvyšováním signálu pozadí.

Pokud se tato souprava použije ke skriningu BCR/ABL P210, použijí se výsledky pro každý vzorek, jak je popsáno v následující tabulce:

Sample Threshold Cycle (FAM)		Sample Suitability	Assay result	BCR/ABL P210 mRNA
P210	ABL			
Ct Undetermined	Copies < 10,000 or undetermined	NOT SUITABLE	INVALID	/
	Copies > 10,000	SUITABLE	VALID, NEGATIVE	NOT DETECTED
Ct Determined	Copies < 10,000 or undetermined	SUITABLE	VALID, POSITIVE	PRESENT
	Copies > 10,000	SUITABLE	VALID, POSITIVE	PRESENT

Pokud reakce amplifikace vzorku ukazuje „Ct undetermined“ pro P210 a „Copies“ <10 000 nebo Ct Undetermined“ pro ABL, nebyl cílový gen ABL účinně detekován. Problémy se vyskytly během fáze amplifikace (neúspěšná nebo nevalidní amplifikace) nebo ve fázi reverzní transkripce (neúspěšná nebo nevalidní reverzní transkripce) nebo ve fázi extrakce (absence DNA nebo přítomnost inhibitorů), což může způsobit nesprávné výsledky a falešné negativy.

Vzorek není vhodný, test je neplatný a musí se opakovat počínaje extrakcí nového vzorku

Pokud amplifikační reakce vzorku ukazuje „Ct undetermined“ pro P210 a „Copies > 10.000“ pro ABL, cílový gen ABL byl detekován úspěšně, zatímco cílový gen BCR/ABL nebyl detekován. Není však možné vyloučit přítomnost cDNA P210 při nižším titru, než je detekční limit produktu. V tomto případě by byl výsledek falešně negativní.

Výsledky získané touto analýzou musí být interpretovány s ohledem na všechny klinické údaje a další laboratorní testy provedené na pacientovi.

Poznámka: Pokud je detekován P210, zatímco amplifikace ABL ukazuje „Kopie <10 000 nebo Ct neurčeno“, znamená to, že vzorek je stále kvalitativně vhodný a pozitivní výsledek testu je platný. V tomto případě však není možné použít data pro kvantitativní analýzu výsledků (viz následující stránky).

- Kvantitativní analýza BCR/ABL P210:**
Hodnoty Ct získané P210 specifickou sondou a P210 kalibrační křivkou se používají pro výpočet množství cílové DNA přítomné v amplifikačních reakcích každého vzorku.

SensiQuant 210 MasterMix je schopen měřit od 1 000 000 do 5 kopií P210 cDNA na amplifikační reakci, jak ukazuje následující tabulka

Result of the sample (FAM P210)	BCR/ABL P210 cDNA per reaction
Quantity > 1 x 10 ⁶	GREATER THAN 1.000.000 DI COPIES
5 ≤ Quantity ≤ 1 x 10 ⁶	= quantity
Quantity < 5	FEWER THAN 5 COPIES

Hodnoty Ct získané ABL specifickou sondou a ABL kalibrační křivkou se používají pro výpočet množství cílové DNA přítomné v amplifikačních reakcích každého vzorku.

SensiQuant ABL MasterMix je schopen měřit od 1 000 000 do 5 kopií pro ABL cDNA na amplifikační reakci. Pro kvantitativní analýzu je však užitečný interval od 1 000 000 do 10 000 kopií.

Pokud se tento produkt používá ke sledování hladiny P210, použijí se výsledky kvantity k výpočtu celkového počtu kopií cDNA P210 (**součet kopií v každé replikaci**) normalizovaných k celkovému počtu kopií cDNA ABL (**součet kopií v každé replikaci**) podle tohoto vzorce:

$$P210\% = \frac{\text{Quantity of BCR/ABL P210 (sum of copies)}}{\text{Quantity of ABL (sum of copies)}} \times 100$$

Před výpočtem P210% je nutné analyzovat data získaná ve dvou opakovaných vzorcích. Následující tabulka ukazuje různé případy, které se mohou vyskytnout v jedné amplifikační relaci, a doporučený přístup k vyhodnocení dat:

Sample	Sample suitability	cDNA of P210	Quantity of P210 cDNA	Quantity of ABL cDNA
1 st repeat	Suitable	PRESENT	Sum quantity of P210	Sum quantity of ABL
2 nd repeat	Suitable	PRESENT		
1 st repeat	Suitable	NOT DETECTED	0	Sum quantity of ABL
2 nd repeat	Suitable	NOT DETECTED		
1 st repeat	Suitable	PRESENT (< 3 copies)	3 copies of P210 (*)	Sum quantity of ABL
2 nd repeat	Suitable	NOT DETECTED		
1 st repeat	Suitable	PRESENT (> 3 copies)	Quantity of P210	Sum quantity of ABL
2 nd repeat	Suitable	NOT DETECTED		
1 st repeat	Not suitable	PRESENT/NOT DETECTED	Retest the sample	
2 nd repeat	Suitable	PRESENT/NOT DETECTED		
1 st repeat	Not suitable	PRESENT/NOT DETECTED	Retest the sample	
2 nd repeat	Not suitable	PRESENT/NOT DETECTED		

(*) Pokud je počet kopií P210 <3, ale stále existuje, měly by být pro výpočet poměru P210/ABL použity hodnoty 3.

(v souladu s italskou sítí LabNet a evropskou studií léčby a výsledků pro CML - program EUTOS).

Poznámka: Výsledky tohoto testu by měly být interpretovány na základě všech klinických údajů a dalších laboratorních testů pacienta.

OMEZENÍ TESTU

S touto soupravou

- Používejte pouze celkovou RNA extrahovanou ze vzorků periferní a/nebo medulární krve, shromážděných v EDTA nebo citrátu a lymfocytárních suspenzích a/nebo leukocytech.
- Nepoužívejte celkovou RNA extrahovanou z heparinovaných vzorků: heparin inhibuje reverzní transkripční a amplifikační reakce nukleových kyselin a způsobuje neplatné výsledky.
- Nepoužívejte celkovou RNA kontaminovanou hemoglobinem nebo Ficoll™: tyto látky mohou inhibovat reverzní transkripční a amplifikační reakce nukleových kyselin a způsobit neplatné výsledky.

Nejsou k dispozici žádné údaje týkající se inhibice způsobené antibiotiky, antivirovými léčivými, chemoterapeutiky nebo imunosupresivy.

Výsledky získané tímto produktem jsou ovlivňovány správným odběrem, přepravou, skladováním a přípravou vzorků. Abyste předešli nesprávným výsledkům věnujte pozornost těmto před-analytickým fázím.

Kvůli vysoké analytické citlivosti je test amplifikace nukleových kyselin použitý v tomto produktu citlivý na kontaminace z klinických vzorků, které jsou pozitivní na P210, z pozitivních kontrol a ze samotných produktů amplifikační reakce. Kontaminace vede k falešně pozitivním výsledkům. Produkt byl navržen tak, aby snížil kontaminaci; tomuto fenoménu však lze zabránit pouze dodržováním správných laboratorních postupů a důsledným dodržováním pokynů uvedených v této příručce.

Tento produkt vyžaduje:

- personál vyškolený v oblasti zpracování potenciálně infekčních biologických vzorků a chemických přípravků klasifikovaných jako nebezpečné, aby se předešlo nehodám s potenciálně závažnými následky pro uživatele a jiné osoby.
- používání pracovních oděvů a prostor, které jsou vhodné pro zpracování potenciálně infekčních biologických vzorků a chemických přípravků klasifikovaných jako nebezpečné, aby se zabránilo nehodám s potenciálně závažnými následky pro uživatele a další osoby.
- personál vyškolený v technikách molekulární biologie, jako je extrakce, amplifikace a detekce nukleových kyselin, aby se zabránilo nesprávným výsledkům.

- přítomnost oddělených oblastí pro extrakci/přípravu amplifikačních reakcí a pro amplifikaci/detekci amplifikačních produktů, aby se zabránilo falešně pozitivním výsledkům.
- použití speciálního oděvu a nástrojů pro extrakci/přípravu amplifikačních reakcí a pro amplifikaci/detekci amplifikačních produktů, aby se zabránilo falešně pozitivním výsledkům.

Negativní výsledek získaný u tohoto produktu naznačuje, že cDNA P210 nebyla detekována v produktu reverzní transkripce získané z RNA extrahované ze vzorku, ale může také obsahovat cDNA P210 při nižším titru, než je detekční limit pro produkt (detekční limit produktu, viz odstavec Výkonnostní charakteristiky na straně 11); v tomto případě by byl výsledek falešně negativní

Jako v případě jakéhokoli diagnostického prostředku:

- výsledky získané tímto přípravkem musí být interpretovány s ohledem na všechny klinické údaje a další laboratorní testy provedené pacientovi.
- existuje zbytkové riziko získání neplatných výsledků, falešných pozitivit a falešných negativit. Toto zbytkové riziko nelze dále vyloučit nebo snížit. Ve zvláštních situacích, jako jsou nouzové diagnózy, může toto zbytkové riziko přispět k nesprávným rozhodnutím s potenciálně závažnými důsledky pro pacienta.

PRŮVODCE ŘEŠENÍM PROBLÉMŮ

Negativní výsledek pro kontrolní gen (ABL) pro BCR/ABL ve všech vzorcích, Standard OK	
Pravděpodobná příčina	Doporučená opravná akce
Špatná kvalita vzorku RNA	Před začátkem testu vždy ověřte kvalitu a koncentraci RNA
Chyba v kroku RT	Ověřte pipetovací schéma a nastavení reakce
Chyba pipetování nebo vynechání vzorku	Ověřte pipetovací schéma a nastavení reakce
Inhibiční efekt některých materiálů vzorku způsobený špatnou purifikací	Opakujte purifikaci RNA
Negativní výsledek pro kontrolní gen (ABL) ve všech vzorcích, Standard OK	
Pravděpodobná příčina	Doporučená opravná akce
Špatná kvalita vzorku RNA	Před začátkem testu vždy ověřte kvalitu a koncentraci RNA
Chyba v kroku RT	Ověřte pipetovací schéma a nastavení reakce
Chyba pipetování nebo vynechání vzorku	Ověřte pipetovací schéma a nastavení reakce
Negativní signál Standardu	
Pravděpodobná příčina	Doporučená opravná akce
Chyba pipetování	Ověřte pipetovací schéma a nastavení reakce
	Opakujte PCR běh
Nesprávné skladování komponent	Alikvotujte reagentie
Degradace standardu	SensiQuant MasterMix skladujte při – 15 - -25°C chráněný před světlem
	Zamezte opakovanému zmrazování/rozmrazování
	Použijte nové alikvoty SensiQuant Standard
Kalibrační křivka není lineární ($R^2 < 0,99$)	
Pravděpodobná příčina	Doporučená opravná akce
Chyba pipetování	Ověřte pipetovací schéma a nastavení reakce
	Opakujte PCR běh
Zkřížená kontaminace nebo nespecifická kontaminace	Vyměňte všechny kritické reagentie
	Zamezte opakovanému zmrazování/rozmrazování
	Opakujte experiment s novými alikvoty reagentií
Částečná degradace standardu	Vyčistěte povrchy a přístroje, vyperte laboratorní plášť, vyměňte zkumavky a špičky
	Soupravu SensiQuant MasterMix skladujte při – 15 - -25°C chráněný před světlem
	Zamezte opakovanému zmrazování/rozmrazování
Nesprávné nastavení pasivní reference	Ověřte nastavené pasivní reference. Nastavte ROX

Negativní kontrola (H₂O) je pozitivní	
Pravděpodobná příčina	Doporučená opravná akce
Zkřížená kontaminace	Vyměňte všechny kritické reagensy
	Opakujte experiment s novými alikvoty reagensů
	Vždy zpracovávejte vzorky, složky soupravy a použitý materiál v souladu s obecně uznávanými pravidly, aby se zabránilo zkřížené kontaminaci
	Vyčistěte povrchy a přístroje, vyperte laboratorní plášť, vyměňte zkumavky a špičky
Mikrodestička byla špatně uzavřená	Pozorně zavírejte mikrodestičku
Degradace sondy	SensiQuant MasterMix skladujte při – 15 - -25°C chráněný před světlem
Není signál ani u kontroly standardu	
Pravděpodobná příčina	Doporučená opravná akce
Nebyl vybrán správný kanál pro detekci	Nastavte správný kanál
Chyba pipetování nebo vynechání reagensy	Ověřte pipetovací schéma a nastavení reakce
	Opakujte PCR běh
Degradace sondy	Použijte nový alikvot SensiQuant MasterMix
Degradace standardu	Použijte nový alikvot SensiQuant Standard
Inhibiční efekt materiálu ve vzorku způsobený nedostatečnou purifikací	Opakujte DNA Purifikaci
Nízká intenzita fluorescence	
Pravděpodobná příčina	Doporučená opravná akce
Špatné skladování součástí soupravy	Alikvotujte reagensy
	SensiQuant MasterMix skladujte při – 15 - -25°C chráněný před světlem
	Zamezte opakovanému zmrazování/rozmrazování
Velice nízké iniciální množství cílové RNA	Před začátkem vždy ověřte koncentraci RNA

ODKAZY A SYMBOLY

J. Gabert et al. (2003) *Leukaemia* 17: 2318-2357
 E. Beillard et al. (2003) *Leukaemia* 17: 2474-2486
 J. Gabert et al. (2003) *Leukemia* 17: 2318-2357
 E. Beillard et al. (2003) *Leukemia* 17: 2474-2486
 S. Branford et al., (2006) *Leukemia* 20(11):1925-30
 T. Hughes et al., (2006) *Blood* 1;108(1):28-37.
 M. Silvy et al., (2005) *Leukemia* 19(2):305-7
 D.A. Thomas et al., (2007) *Hematology ASH Educ Program*. 2007 435-43.
 V.H. van der Velden et al., (2003) *Leukemia* 17(6):1013-34.



Katalogové číslo



Skladujte při/ omezení teploty



Šarže



Použitelné do

Tento výrobek splňuje požadavky
Evropské Direktivy 98/79/ECPro *in vitro* diagnostické použití

Obsah stačí pro <n> testů



Upozornění/Pozor



Výrobce

Distribuce:

ASCO-MED, spol. s.r.o.

Pod Cihelnou 6/664, 161 00 Praha 6

tel: (+420) 233 313 578

www.ascomed.cz

asco@ascomed.cz

Mgr. Irena Šejbová

Mobil: 602 653 640

irena.sejbova@asomed.cz

PRACOVNÍ LIST

Datum:

Operator:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												