

Novembre 2017

Manuel du kit *ipsogen*[®]

PML-RARA bcr1



24

Version 1

Diagnostics in vitro quantitatifs

À utiliser sur les appareils Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®], Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System, LightCycler[®] et SmartCycler[®]

IVD



REF

672123

QIAGEN GmbH

QIAGEN Strasse 1,

40724 Hilden

ALLEMAGNE



R5 **MAT**

1108718FR



Sommaire

Utilisation prévue.....	5
Résumé et description du test.....	5
Principe de la technique.....	8
Matériel fourni.....	11
Contenu du kit.....	11
Matériel nécessaire mais non fourni.....	12
Avertissements et précautions.....	14
Précautions générales.....	14
Stockage et manipulation des réactifs.....	16
Procédure.....	17
Préparation de l'échantillon d'ARN.....	17
Protocole : Protocole EAC de transcription inverse standardisé et recommandé.....	17
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.....	20
Protocole : Réalisation d'une qPCR sur un appareil ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ou LightCycler 48024.....	29
Protocole : Réalisation d'une qPCR sur un appareil LightCycler 1.2 ou 2.0.....	29
Protocole : réalisation d'une qPCR sur un appareil SmartCycler.....	34
Interprétation des résultats.....	38
Principe d'analyse des données.....	38
Résultats.....	39
Résolution des principaux problèmes rencontrés.....	43

Contrôle qualité.....	47
Limites.....	47
Caractéristiques de performance.....	48
Études non cliniques.....	48
Études cliniques.....	51
Références.....	56
Symboles.....	57
Pour commander.....	58

Utilisation prévue

Le kit *ipsogen* PML-RARA bcr1 est conçu pour la quantification des transcrits de fusion dans les échantillons de moelle osseuse ou de sang périphérique d'un sous-groupe de patients atteints de leucémie aiguë myéloïde (LAM) pour lesquels un type cytomorphologique M3 et une translocation t(15;17)(q22;q21) avec point de cassure du gène PML au niveau de l'intron 6 ont été diagnostiqués. Les résultats obtenus doivent contribuer au suivi de l'efficacité thérapeutique chez les patients sous traitement ainsi que de la maladie résiduelle imperceptible (MRI) afin de détecter toute récurrence.

Résumé et description du test

Les transcrits du gène de fusion (FG - fusion gene) PML-RARA, résultats moléculaires de la translocation t(15;17)(q22;q21) sont associés à la majorité des cas de leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) (> 90 %), un sous-type distinct de LAM de type cytomorphologique M3 qui représente 10 à 15 % des cas de LAM. La translocation t(15;17) réciproque équilibrée entraîne la fusion du gène de la leucémie promyélocytaire (PML) vers le récepteur alpha de l'acide rétinoïque (RARA) pour générer la protéine de fusion PML-RARA. La protéine chimère PML-RARA est un répresseur transcriptionnel. Son expression est associée à une anomalie de la différenciation myéloïde, découlant d'une affinité accrue avec le co-répresseur N (NcoR), d'une altération de la structure de la chromatine par l'histone déacétylase (HDAC) et d'une inhibition de la transcription. L'acide tout trans rétinoïque (ATRA) est très efficace dans le traitement de la LAP : son action s'apparente à celle d'un agent de différenciation, ce qui favorise la libération du complexe NCoR/HDAC et rétablit une transcription normale.

Dans le gène RARA, les points de cassure interviennent toujours au niveau de l'intron 2. L'emplacement des points de cassure au sein du gène PML (intron 6, exon 6 ou intron 3) détermine la formation de sous-types de transcrits de PML-RARA soit, respectivement, une forme longue (L ou bcr1), une forme intermédiaire (V ou bcr2) et une forme courte (S ou bcr3) (figure 1). Ces sous-types représentent respectivement 55 %, 5 % et 40 % des cas.

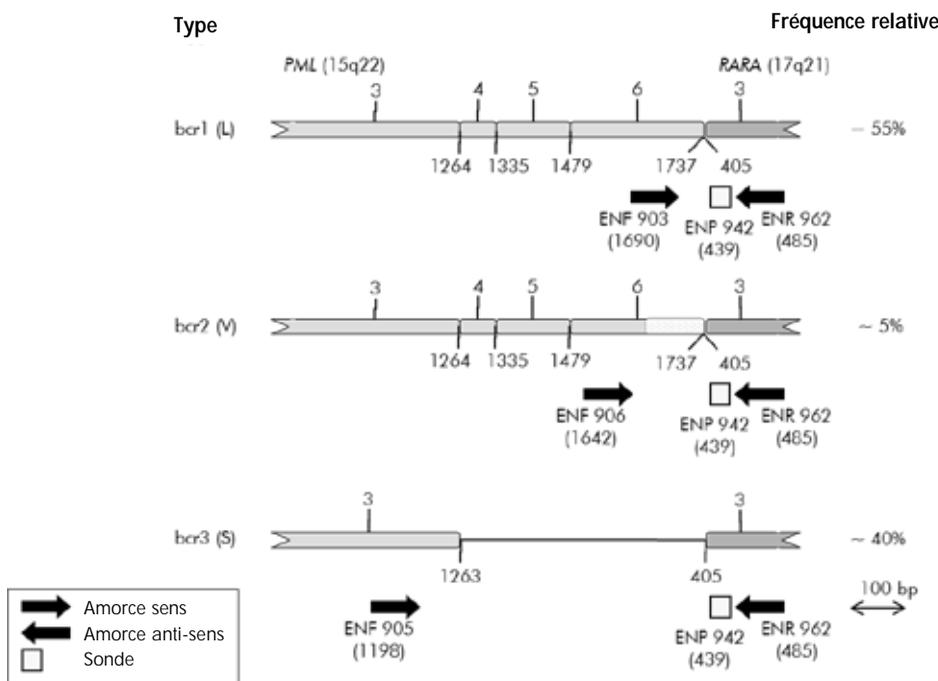


Figure 1. Représentation schématique du transcrit du FG PML-RARA couvert par le jeu de sonde et amorces EAC qPCR. Pour le type bcr1 (L) : ENF903–ENP942–ENR962. Pour le type bcr2 (V) : ENF906–ENP942–ENR962. Pour le type bcr3 (S) : ENF905–ENP942–ENR962. Le numéro qui figure sous les amorces et la sonde désigne la position du nucléotide dans le transcrit du gène normal. La fréquence relative indique la proportion de chaque transcrit du FG parmi les variantes de PML-RARA.

L'association d'une chimiothérapie à base d'anthracyclines avec l'ATRA s'avère très efficace dans le traitement de la LAP, permettant des rémissions durables et une guérison possible chez 70 % des patients nouvellement diagnostiqués. Toutefois, des récives et un faible taux de survie est encore observé chez 15 à 25 % des patients. La détection du gène de fusion PML-RARA au moyen de la technique conventionnelle de transcription inverse et d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) qualitative est largement employée pour le diagnostic rapide et la prédiction de la réponse thérapeutique. Cette méthode présente cependant des inconvénients et sa sensibilité est relativement faible.

La quantification du nombre de copies de PML-RARA par PCR quantitative en temps réel (qPCR) a plusieurs avantages. Caractérisée par une haute sensibilité et une haute reproductibilité, cette technique permet également d'évaluer la cinétique. L'analyse de la valeur pronostique d'un protocole de qPCR standardisé très répandu (programme EAC), appliqué lors des différentes phases de traitement des patients atteints de LAP, a indiqué que cette approche constitue une alternative fiable pour l'évaluation de la MRI, et que la stratification du risque de récive pouvait être établie d'après le nombre de copies normalisé de PML-RARA. Lors de l'analyse consécutive au traitement de consolidation, l'obtention d'un test qPCR positif est un puissant facteur de prédiction de rechute hématologique. Au cours du traitement d'entretien, puis au-delà, un résultat positif du test qPCR est associé à un risque supérieur de récive et à une survie plus courte. La stratification du risque de récive établie d'après la quantification du nombre de copies normalisé (NCN) de PML-RARA classe les patients en 3 groupes : ceux qui présentent un risque élevé de récive, ceux qui présentent un risque intermédiaire, et ceux qui présentent un faible risque de récive (1). La surveillance du gène PML-RARA au moyen de la détection sensible de son transcrite est considérée comme faisant partie intégrante de la stratégie thérapeutique globale de la LAP (voir les références 2 et 3 pour de plus amples détails). Elle permet de moduler le type et l'intensité du traitement chez les patients exposés à différents niveaux de risque de récive pendant leur suivi.

La standardisation et la validation de la méthode de quantification de la MRI ont été établies lors d'une étude multicentrique menée par l'EAC et publiée en 2003 (4, 5). Le principe du kit *ipsogen* PML-RARA bcr1 repose sur cette technique.

Principe de la technique

La qPCR est une technique qui permet une quantification précise des produits de PCR lors de la phase exponentielle du processus d'amplification par PCR. En outre, 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. 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' à 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.

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' à 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 2). 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.

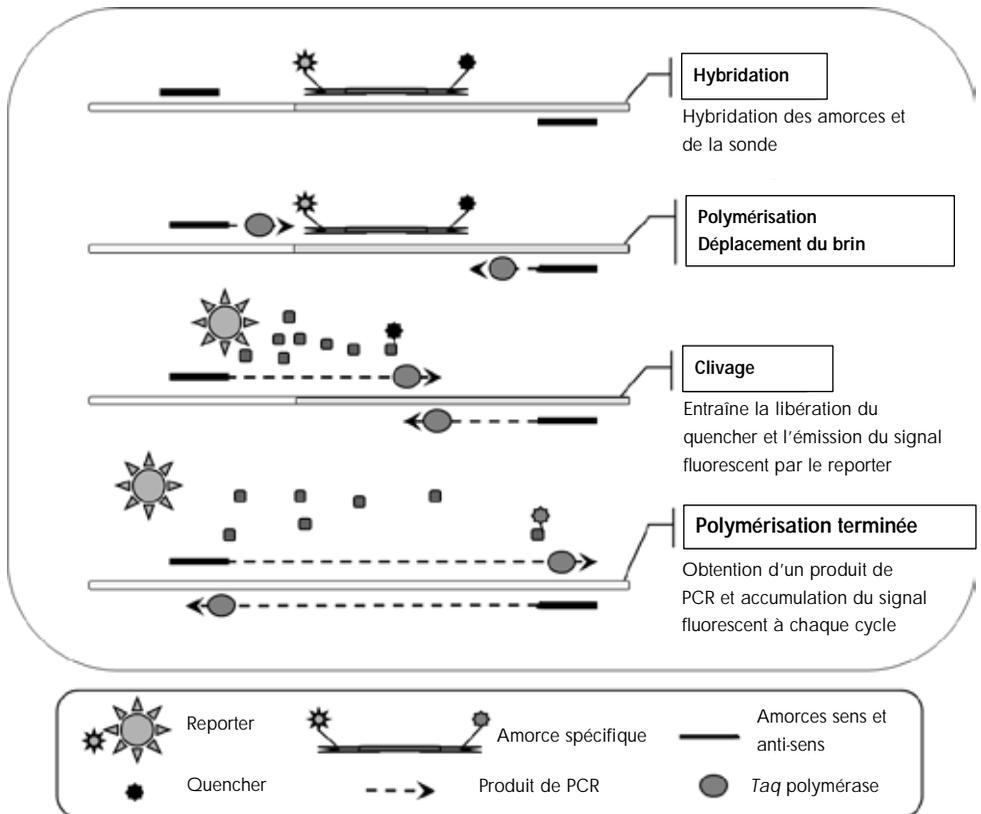


Figure 2. Principe de la réaction. L'ARN total fait l'objet d'une transcription inverse et l'ADNc généré est amplifié par PCR à l'aide de deux amorces spécifiques et d'une sonde doublement marquée interne spécifique (FAM™-TAMRA™). À chaque étape d'hybridation induite par la PCR, la sonde se fixe à l'amplicon. L'extension de la *Taq* de l'amorce fixée à l'amplicon déplace l'extrémité 5' de la sonde qui est alors dégradée par l'activité exonucléase 5' à 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

<i>ipsogen PML-RARA bcr1 Kit</i>		(24)
Référence		672123
Nombre de réactions		24
Composant	Nom	Quantité
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
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Dilution standard pour le gène de fusion PML-RARA bcr1) (10 ¹ copies/5 µl)	F1-PML-RARA bcr1	50 µl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Dilution standard pour le gène de fusion PML-RARA bcr1) (10 ² copies/5 µl)	F2-PML-RARA bcr1	50 µl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Dilution standard pour le gène de fusion PML-RARA bcr1) (10 ³ copies/5 µl)	F3-PML-RARA bcr1	50 µl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Dilution standard pour le gène de fusion PML-RARA bcr1) (10 ⁵ copies/5 µl)	F4-PML-RARA bcr1	50 µl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Dilution standard pour le gène de fusion PML-RARA bcr1) (10 ⁶ copies/5 µl)	F5-PML-RARA bcr1	50 µl
Primers and Probe Mix ABL (Mélange sonde et amorces ABL)*	PPC-ABL 25x	90 µl
Primers and Probe Mix PML-RARA bcr1 Fusion Gene (Mélange sonde et amorces de détection du gène de fusion PML-RARA bcr1) [†]	PPF-PML-RARA bcr1 25x	110 µl
<i>ipsogen PML-RARA bcr1 Kit Handbook (Manuel du kit ipsogen PML-RARA bcr1)</i> (anglais)		1

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

[†] Mélange d'amorces sens et anti-sens pour le gène de fusion PML-RARA bcr1 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

Lors de la 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.

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

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

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

Équipement

- I Pipette microlitre spéciale PCR (1–10 µl ; 10–100 µl ; 100–1000 µl)
- I Micro-centrifugeuse avec rotor pour tubes de réaction de 0,2 ml/0,5 ml (avec vitesse maximale à 13 000/14 000 tpm)
- I Système de PCR en temps réel : Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ou autre séquenceur RotorGene Q ; LightCycler 1.2, 2.0 ou 480 ; ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900HT SDS ; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ; ou SmartCycler ; et matériel spécifique associé
- I Thermocycleur ou bain-marie (étape de transcription inverse)

Réactifs complémentaires

- I Kit de contrôles *ipsogen* PML-RARA bcr1 (n° réf. 672091) pour travaux de recherches uniquement, composé de lignées cellulaires à expression négative, faible et élevée du gène de fusion PML-RARA bcr1, pour la validation qualitative de l'extraction de l'ARN et de la transcriptase inverse

Avertissements et précautions

Pour utilisation en diagnostic in vitro

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

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

Précautions générales

Les tests de qPCR nécessitent la mise en place de bonnes pratiques de laboratoire, et notamment la maintenance de l'équipement, spécifiques à la biologie moléculaire et conformes aux réglementations et aux normes en vigueur.

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 :

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

Nous recommandons par conséquent :

- I d'utiliser des consommables exempts de nucléase (par ex. pipettes, cônes, tubes) et de porter des gants lors de l'expérience.
- I d'utiliser de nouveaux cônes aérosol-résistants à toutes les étapes de pipetage pour éviter les contaminations croisées des échantillons et des réactifs.
- I 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.).
- I de manipuler les dilutions standard (C1-3 et F1-5) dans une pièce séparée.

Stockage 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 la 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

Avant de commencer

- I Préparer les dNTP, 10 mM chacun. Conserver en aliquotes à -20 °C.
- I Préparer l'hexamère aléatoire, 100 µM. Conserver en aliquotes à -20 °C.
- I Préparer le MgCl₂, 50 mM. 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 ensuite sur la glace.
4. Préparer le mélange TI (transcription inverse) suivant en fonction du nombre d'échantillons analysés (tableau 1).

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

Tableau 1. 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/µl)	0,5	1 U/µl
Inhibiteur des RNases (40 U/µl)	0,5	1 U/µl
Hexamère aléatoire (100 µM)	5,0	25 µM
Transcriptase inverse Superscript II ou Superscript (200 U/µl)	0,5	5 U/µl
Échantillon d'ARN chauffé (à ajouter à l'étape 5)	1,0–4,0	50 ng/µl
Eau exempte de nucléase pour PCR (à ajouter à l'étape 5)	0,0–3,0	–
Volume final	20,0	–

5. Pipeter 16 µl du mélange TI dans chaque tube de PCR. Ajouter ensuite 1 à 4 µl (1 µg) d'ARN (obtenu à l'étape 3) et ajuster le volume à 20 µl avec de l'eau exempte de nucléase pour PCR (voir tableau 2).

Tableau 2. Préparation de la réaction par transcription inverse

Composant	Volume (µl) (Volume (µl))
Mélange TI	16
Échantillon d'ARN chauffé (1 µg)	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 ensuite sur la glace.
11. Diluer l'ADNc résultant avec 30 µl d'eau exempte de nucléase pour PCR afin d'obtenir un volume final de 50 µl.
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 3.

Tableau 3. 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 H2O	2 réactions
Avec le mélange sonde et amorces PML-RARA bcr1 (PPF-PML-RARA bcr1)	
n échantillons d'ADNc	n x 2 réactions
Standard PML-RARA	2 x 5 réactions (5 dilutions, chacun testé en double)
Contrôle H2O	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.

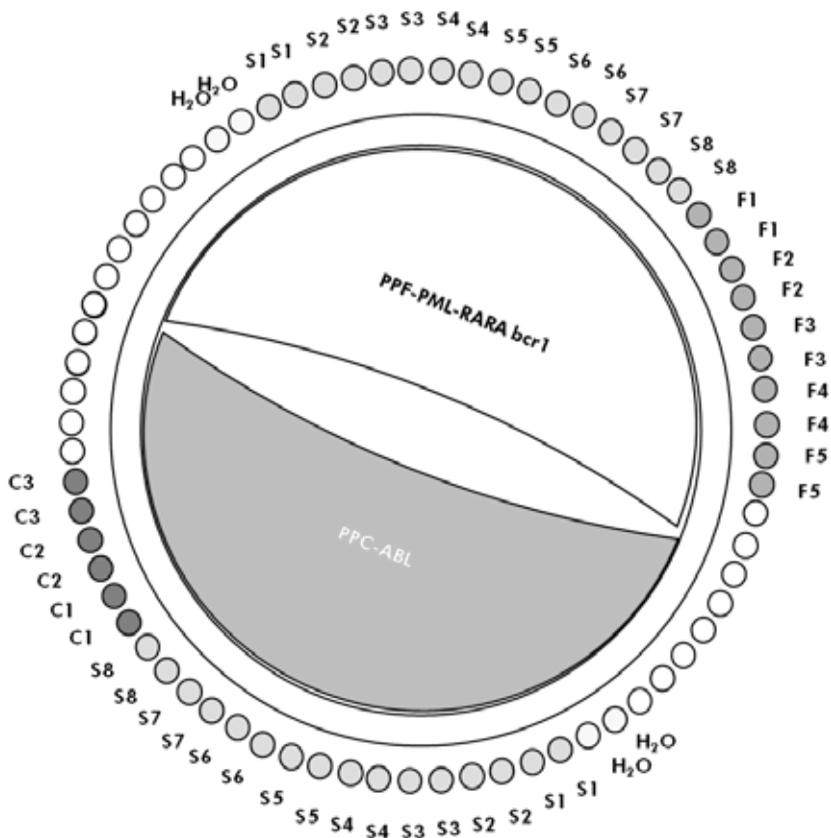


Figure 3. Suggestion de configuration du rotor pour chaque expérience réalisée à l'aide du kit *ipsogen* PML-RARA bcr1. F1–5 : standards PML-RARA bcr1 ; C1–3 : standards ABL ; S : échantillon d'ADNc ; H₂O : contrôle H₂O.

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 4 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-PML-RARA bcr1). Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

Tableau 4. Préparation du mélange de qPCR

Composant	ABL :			PML-RARA bcr1 :	Concentration finale
	1 réaction (µl)	24 + 1 réactions (µl)	28 + 1 réactions (µl)	28 + 1 réactions (µl)	
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 µl du pré-mélange de qPCR par tube.
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 17) 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 5.

Tableau 5. Profil de température

Mode d'analyse :	Quantitation
Plateau	Température : 50 °C Durée : 2 min
Plateau 2	Température : 95 deg. Durée : 10 min
Cycles	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. Lancer le programme de thermocyclage, comme indiqué dans le tableau 5.
9. 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.

Protocole : Réalisation d'une qPCR sur un appareil ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 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 6.

Tableau 6. 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 H2O	2 réactions
Avec le mélange sonde et amorces PML-RARA bcr1 (PPF-PML-RARA bcr1)	
n échantillons d'ADNc	n x 2 réactions
Standard PML-RARA	2 x 5 réactions (5 dilutions, chacun testé en double)
Contrôle H2O	2 réactions

Analyse des échantillons sur un appareil ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 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 4 montre un exemple d'une telle expérience.

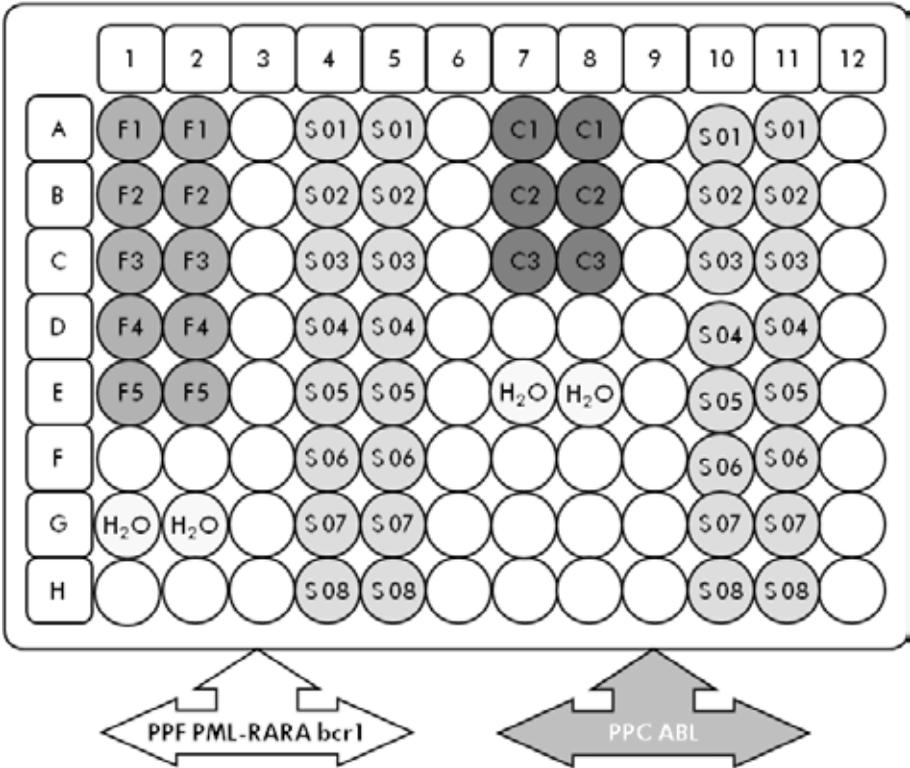


Figure 4. Suggestion de configuration de plaque pour une expérience. S : échantillon d'ADNc ; F1-5 : standards PML-RARA bcr1 ; C1-3 : standards ABL ; H₂O : contrôle H₂O.

Réalisation d'une qPCR sur un appareil ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ou LightCycler 480

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 7 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-PML-RARA bcr1). Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

Tableau 7. Préparation du mélange de qPCR

Composant	ABL :		PML-RARA bcr1 :	
	1 réaction (µl)	24 + +1 réactions (µl)	28 + +1 réactions (µl)	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 µl du pré-mélange de qPCR par puits.
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 17) dans le puits correspondant (volume total 25 µl).
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 8 pour les appareils ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900HT SDS, et Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ou dans le tableau 9 pour le LightCycler 480.

Tableau 8. Profil de température pour les appareils ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900HT SDS, et Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System

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

Tableau 9. Profile 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 ».
Plateau	Température : 50 °C Durée : 2 minutes
Plateau 2	Température : 95 °C Durée : 10 minutes
Cycles	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 appareils ABI PRISM 7000, 7700 ou 7900HT SDS, et Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, suivre l'étape 8a. Pour le LightCycler 480, se référer à l'étape 8b.

- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 et 7900HT SDS, et Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System : lors de l'analyse, 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, comme indiqué dans le tableau 8.
- 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 9.

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 10.

Tableau 10. 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 en double)
Contrôle H ₂ O	1 réaction
Avec le mélange sonde et amorces PML-RARA bcr1 (PPF-PML-RARA bcr1)	
n échantillons d'ADNc	n x 2 réactions
Standard PML-RARA bcr1	1 x 5 réactions (5 dilutions standard, chacune testée en double)
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 5 montre un exemple d'une telle expérience.

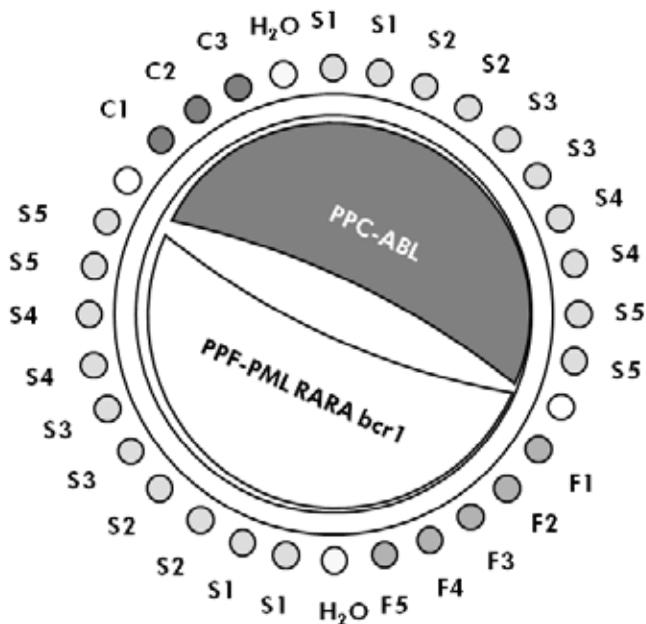


Figure 5. Suggestion de configuration du rotor pour chaque expérience réalisée à l'aide du kit *ipsogen* PML-RARA bcr1. F1–5 : standards PML-RARA bcr1 ; C1–3 : standards ABL ; S : échantillon d'ADN inconnu à analyser ; H₂O : contrôle H₂O.

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 11 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-PML-RARA bcr1). Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

Tableau 11. Préparation du mélange de qPCR

Composant	1 réaction (µl)	PML-RARA		Concentration finale
		ABL : 14 + 1 réactions (µl)	bcr1 : 16 + 1 réactions (µl)	
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	5 chacun	5 chacun	–
Volume total	20	20 chacun	20 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 17) 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 12.

Tableau 12. Profil de température

Mode d'analyse :	Quantification
Plateau	Température : 95 °C Durée : 10 minutes Rampe : 20
Cycles	50 fois 95 °C pendant 10 secondes ; rampe : 20 60 °C pendant 1 minute ; rampe : 20 ; avec acquisition de la fluorescence FAM : Single
Plateau 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 12.

-
- 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 12.

Protocole : réalisation d'une qPCR sur un appareil SmartCycler

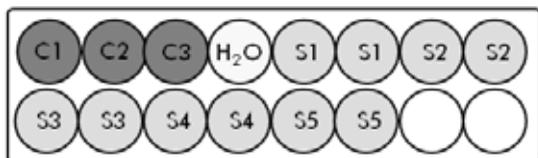
En cas d'utilisation de ce séquenceur, il est recommandé de mesurer les échantillons en double, et les témoins en simple exemplaire, comme indiqué dans le tableau 13.

Tableau 13. 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 en double)
Contrôle H ₂ O	1 réaction
Avec le mélange sonde et amorces PML-RARA bcr1 (PPF-PML-RARA bcr1)	
n échantillons d'ADNc	n x 2 réactions
Standard PML-RARA bcr1	1 x 5 réactions (5 dilutions standard, chacune testée en double)
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 6 montre un exemple d'une telle expérience.



Toutes les analyses sur le premier bloc sont réalisées avec le produit PPC-ABL



Toutes les analyses sur le deuxième bloc sont réalisées avec le produit PPF-PML-RARA bcr1

Figure 6. Suggestion de configuration de plaque pour une expérience. S : échantillon d'ADNc ; F1–5 : standards PML-RARA bcr1 ; C1–3 : standards ABL ; H₂O : contrôle H₂O.

Réalisation d'une qPCR sur un appareil SmartCycler

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 14 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-PML-RARA bcr1). Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

Tableau 14. Préparation du mélange de qPCR

Composant	1 réaction (μl)	ABL : 14 + 1 réactions (μl)	PML-RARA bcr1 : 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 17) dans le tube 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 15.

Tableau 15. Profil de température

Plateau	Température : 50 °C Durée : 2 minutes
Plateau 2	Température : 95 °C Durée : 10 minutes
Cycles	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 15.

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) ABL et 5 dilutions standard pour le gène de fusion (PML-RARA bcr1) afin de garantir la précision des courbes standard. Les figures 7 et 8 montrent un exemple de courbes d'amplification TaqMan obtenues à l'aide du kit *ipsogen* PML-RARA bcr1.

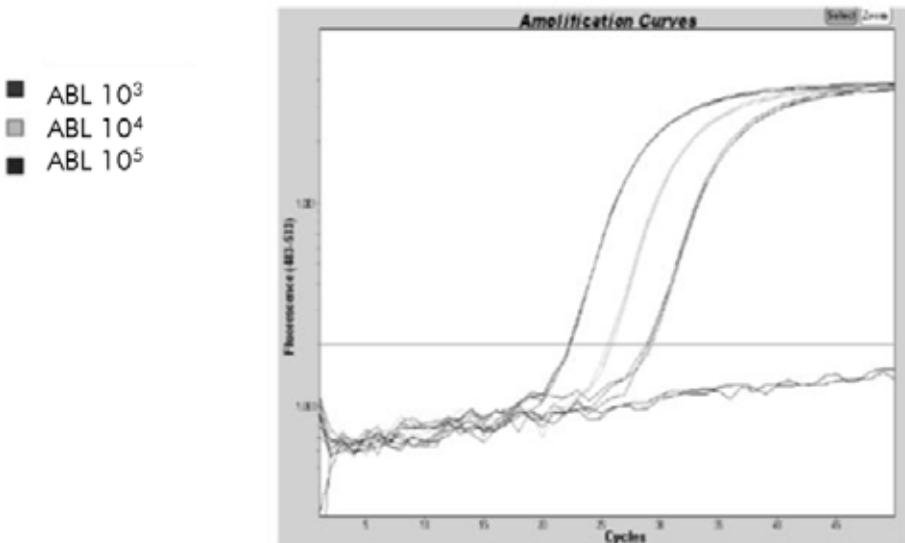


Figure 7. Détection des standards ABL (C1, C2, C3). 10³, 10⁴, et 10⁵ copies/5 µl.

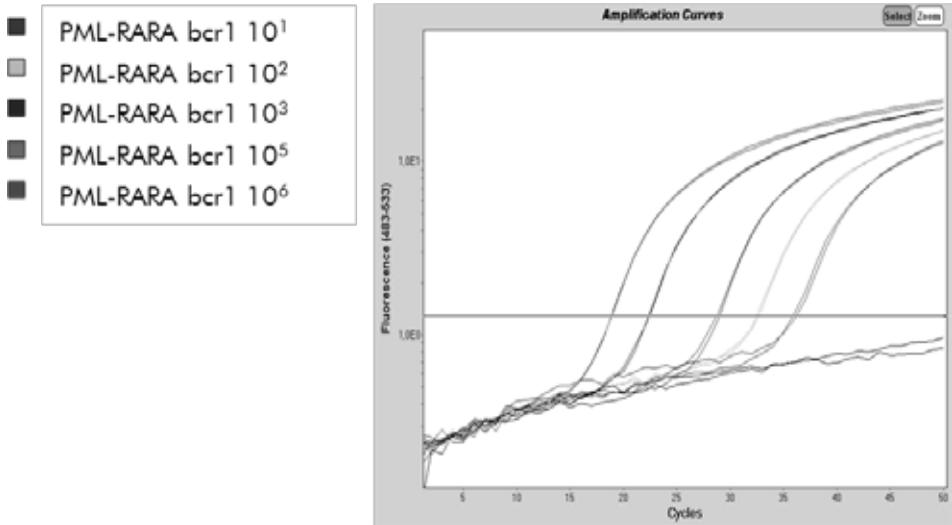


Figure 8. Détection des standards PML-RARA bcr1 (F1-F5). 10¹, 10², 10³, 10⁵ et 10⁶ copies/5 µl.

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 PML-RARA), 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 9 montre un exemple de courbe théorique calculée sur 5 dilutions standard.

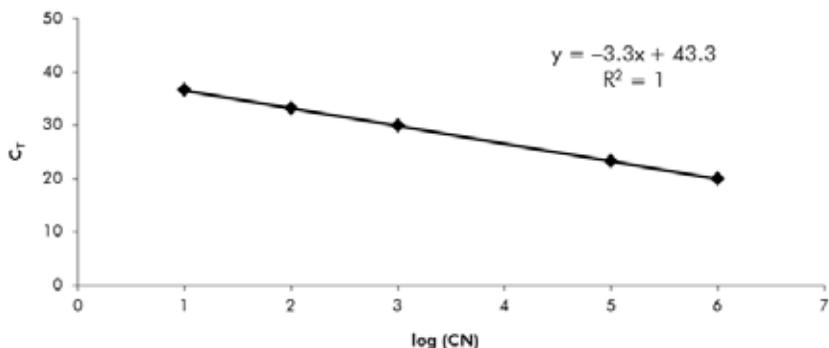


Figure 9. Courbe théorique calculée d'après 5 dilutions standard. Une courbe de régression linéaire ($y = ax + b$) est calculée pour chaque gène (ABL et PML-RARA), où a représente la pente de la courbe et b le point d'intersection avec l'axe des ordonnées y . Son équation et son coefficient de détermination (R^2) figurent sur le graphe.

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 $> 0,95$ (6). Toutefois, une valeur de détermination $R^2 > 0,98$ est souhaitable pour obtenir des résultats précis (7).

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}).

L'équation de la courbe standard PML-RARA doit être utilisée pour convertir les valeurs brutes C_T associées aux échantillons inconnus (obtenues à l'aide du mélange PPF-PML-RARA) en nombre de copies du gène de fusion PML-RARA ($PML-RARA_{CN}$).

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

$$\text{NCN} = \frac{\text{PML-RARA}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}}$$

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 $(\text{FG}_{\text{CN}}/\text{CG}_{\text{CN}})_{\text{FUP}}$ et les échantillons diagnostiques $(\text{FG}_{\text{CN}}/\text{CG}_{\text{CN}})_{\text{DX}}$.

$$\text{Valeur MRI (MRIv)} = \frac{(\text{FG}_{\text{CN}}/\text{CG}_{\text{CN}})_{\text{FUP}}}{(\text{FG}_{\text{CN}}/\text{CG}_{\text{CN}})_{\text{DX}}}$$

Sensibilité

La sensibilité (SENSv) est calculée en fonction de l'expression relative du FG au moment du diagnostic $(\text{FG}_{\text{CN}}/\text{CG}_{\text{CN}})_{\text{DX}}$ et de l'expression du CG $(\text{CG}_{\text{CN}})_{\text{FUP}}$ dans l'échantillon de suivi.

$$\text{Sensibilité (SENSv)} = \frac{\text{CG}_{\text{CN,DX}}}{\text{CG}_{\text{CN,FUP}} \times \text{FG}_{\text{CN,DX}}}$$

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 $\text{ABL}_{\text{CN}} < 1318$ (valeur inférieure à l'IC de 95 % associé aux échantillons patient dans l'étude EAC, référence 5).

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 (6).

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 « Résolution des principaux problèmes rencontrés » ci-dessous pour résoudre le problème.

Résolution des principaux problèmes rencontrés

Ce guide de résolution des principaux problèmes rencontrés peut aider à répondre à certaines questions qui peuvent se poser. Pour plus d'informations, contactez votre coordonnateur clinique ou rendez-vous sur www.qiagen.com.

Commentaires et suggestions

Résultat négatif pour le gène contrôle (ABL) et PML-RARA bcr1 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> PML-RARA bcr1 Controls Kit, réf. 672091*) 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> PML-RARA bcr1 Controls Kit, réf. 672091*) 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> PML-RARA bcr1 Controls Kit, réf. 672091*) 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> PML-RARA bcr1 Controls Kit, réf. 672091*) 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 <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit entre -15 et -30 °C et garder les mélanges sonde et amorces (PPC et PPF) à l'abri de la lumière. Voir « Stockage et manipulation des réactifs », page 16.
Éviter la congélation et la décongélation répétées.
Aliquoter les réactifs pour les stocker. |

Les témoins 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* PML-RARA bcr1 Controls Kit, réf. 672091)* 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* PML-RARA bcr1 Controls Kit, réf. 672091)* en parallèle.

L'intensité de fluorescence est trop faible

- a) Conditions de stockage inappropriées pour les composants du kit
- Conserver le kit *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kit entre -15 et -30 °C et garder les mélanges sonde et amorces (PPC et PPF) à l'abri de la lumière. Voir « Stockage et manipulation des réactifs », page 16.
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

Commentaires et suggestions

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. |
| 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. |
|--------------------|--|

*Le kit de contrôles *ipsogen* PML-RARA bcr1, n° de réf. 672091, est réservé aux travaux de recherches. Ne pas utiliser dans les procédures diagnostiques. Aucune allégation ou déclaration n'est censée être utilisée pour fournir des informations pour le diagnostic, la prévention ou le traitement d'une maladie.

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. Ce kit doit être utilisé conformément au manuel, sur l'un des appareils validés répertoriés dans la section « Matériel nécessaire mais non fourni », page 12.

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 limites 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) (4, 5). Il doit être utilisé selon les instructions données dans ce manuel, avec des réactifs et des appareils validés. 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, RotorGene 3000 et SmartCycler.

Des études non cliniques ont été conduites afin de déterminer les performances analytiques du kit *ipsogen* PML-RARA bcr1. Ces études en laboratoire ont été menées sur de l'ARN total de lignée cellulaire NB4 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 NB4 (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. La concentration des échantillons contenant 5 pg et 0,5 pg d'ARN NB4 dans de l'ARN MV4-11 se sont avérées trop faibles pour générer des résultats (figure 10).

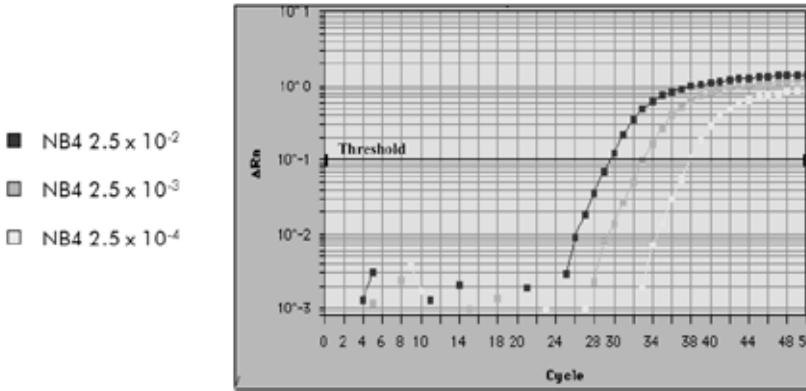


Figure 10. Tracés d'amplification correspondant à des dilutions de $2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng), $2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng), et $2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng) d'ARN total NB4 dans de l'ARN total MV4-11 négatif.

Données analytiques

Les tableaux 16 à 19 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 16. Données inter et intra-essais - Lignées cellulaires PML-RARA et ABL

Lignée cellulaire	Dilution	Analyse inter-essais				Analyse intra-essais	
		C_T moyen :	SD	n	CV (%)	CV min.	CV max.
PML-RARA	5 ng	29,86	0,29	20	0,98	0,32	1,42
	0,5 ng	33,70	0,48	20	1,42	0,56	2,16
	0,05 ng	37,03	0,37	18	1,01	1,07	2,03
ABL	-	24,06	0,22	100	0,92	0,15	2,31

Tableau 17. Analyse inter-essais - Plasmides

Gène	Plasmide	C _T moyen :	SD	n	CV (%)
PML-RARA	F1 (10 ¹ copies)	35,95	0,29	8	0,79
	F4 (10 ² copies)	32,25	0,59	8	1,84
	F3 (10 ³ copies)	28,71	0,55	8	1,90
	F4 (10 ⁵ copies)	22,14	0,49	7	2,23
	F5 (10 ⁶ copies)	18,64	0,72	8	3,84
ABL	C1 (10 ³ copies)	28,85	0,76	7	2,62
	C2 (10 ⁴ copies)	25,25	0,71	8	2,82
	C3 (10 ⁵ copies)	21,74	0,81	8	3,74

Tableau 18. Analyse inter-essais - Lignées cellulaires PML-RARA bcr1 et ABL (CN moyen)

Lignée cellulaire	Dilution	CN moyen	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	2,5 x 10 ² (5 ng/200 µg)	583,95	149,19	20	25,55
	2,5 x 10 ³ (0,5 ng/200 ng)	44,98	12,25	20	27,23
	2,5 x 10 ⁴ (0,05 ng/200 ng)	4,91	1,55	19	31,52
ABL	-	35 171,47	22 448,3	99	63,83

Tableau 19. Analyse inter-essais - Lignée cellulaire PML-RARA bcr1 (NCN moyen)

Lignée cellulaire	Dilution	NCN* moyen	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	2,5 x 10 ⁻² (5 ng/200 ng)	271,4	150,00	20	55,56
	2,5 x 10 ⁻³ (0,5 ng/200 ng)	15,35	8,12	20	52,87
	2,5 x 10 ⁻⁴ (0,05 ng/200 ng)	1,66	0,91	18	55,14
ABL	–	35 171,47	22 448,3	99	63,83

* Pour ces résultats d'études uniquement, le NCN est calculé comme suit $\frac{\text{PML-RARA bcr1}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10\,000$.

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, RotorGene 3000 et SmartCycler.

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 PML-RARA bcr1 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 en 2003 (4, 5).

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

Au total, 11 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 20 présente la moyenne, l'écart type et le CV (%) associés à chaque dilution.

Tableau 20. Reproductibilité inter-laboratoires des standards plasmidiques pour le CG et le FG

Gène	Dilution	Moyenne	ET C _T	CV (%)
Gène contrôle ABL	C1	29,26	0,69	2,31
	C2	25,79	0,65	2,53
	C3	22,40	0,61	2,70
Gène de fusion PML-RARA bcr1	F1	35,84	0,79	2,21
	F2	32,47	0,49	1,50
	F3	28,91	0,34	1,17
	F4	21,82	0,30	1,40
	F5	18,47	0,29	1,55

Valeurs d'expression du transcrit du gène de fusion PML-RARA bcr1

Les tableaux 21 et 22 indiquent les valeurs d'expression du transcrit du gène de fusion PML-RARA bcr1 et du gène contrôle ABL pour la lignée cellulaire NB4, les patients atteints de LAP (valeur au moment du diagnostic de la maladie) et les patients témoins négatifs.

Tableau 21. Valeurs d'expression du transcrit du gène de fusion PML-RARA bcr1 et du gène contrôle ABL— Valeurs C_T

	Valeurs C _T (plage à 95 %)	
	PML-RARA bcr1	ABL
Lignée cellulaire NB4	24,7	23,7
Échantillons prélevés sur des patients atteints de LAP		
Moelle osseuse (n = 14)	25,6 (23,1–27,5)	24,5 (21,7–28,5)
Sang périphérique (n = 9)	25,7 (23,7–29,4)	24,6 (22,0–27,4)
Échantillons prélevés sur des patients négatifs		
Moelle osseuse (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
Sang périphérique (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

Les valeurs C_T associées à l'ABL ne présentent pas de différences significatives entre les échantillons sains et leucémiques, ni entre les types d'échantillons (SP et MO) ou les échantillons correspondant à des patients atteints de LAP.

Tableau 22. Valeurs d'expression du transcrit du gène de fusion PML-RARA bcr1 et du gène contrôle ABL— Valeurs CN et NCN

	Valeurs CN (plage à 95 %)		Valeurs NCN (plage à 95 %)
	PML-RARA bcr1	ABL	CN bcr1/ CN ABL
Échantillons patient			
Moelle osseuse (n = 14)	5129 (1480–25 704)	1538,7 (133,2–46 781,28)	0,30 (0,09–1,82)
Sang périphérique (n = 9)	3891 (475–14 454)	1400,76 (50,27–11 274)	0,36 (0,11–0,78)
Échantillons prélevés sur des patients négatifs			
Moelle osseuse (n = 26)	–	19 201 (12 922–25 480)	–
Sang périphérique (n = 74)	–	21 136 (17 834–24 437)	–

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:

- I Témoins positifs : cellules NB4, une lignée cellulaire bien connue pour exprimer le gène de fusion PML-RARA bcr1 ; échantillons patient déjà testés pour l'expression du PML-RARA bcr1
- I 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 23 présente le nombre et le pourcentage d'échantillons faux négatifs et faux positifs.

Tableau 23. Échantillons faux négatifs et faux positifs

Faux négatifs		Faux positifs	
10^{-3}	10^{-4}	Témoin négatif pour le FG	NAC/NTC
0% (0/29)	0% (0/28)	11% (5/45)	5% (5/100)

Références

1. Santamarie, C. et al. (2007) Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* **92**, 315.
2. Kern, W. et al. (2004) Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **112**, 4.
3. Lo-Coco, F. and Ammantuna, E. (2006) The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology ASH Educ. Program* **514**, 156.
4. 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.
5. 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.
6. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
7. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **20**, 1925.

Symboles

Les symboles suivants peuvent être représentés sur l'emballage et l'étiquette :



<N>

Contient suffisamment de réactifs pour <N> réactions



À utiliser avant



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Référence du catalogue



Numéro de lot



Référence du matériel (c'est-à-dire l'étiquetage des composants)



Code article international (GTIN)



Limite de température



Fabricant



Lire les informations dans le manuel

Historique des révisions du document

R5, novembre 2017

Notes ajoutées que le kit de contrôles *ipsogen* PML-RARA bcr1, n° de cat. 672091, est uniquement destiné à la recherche ; erreurs de frappe mineures corrigées.

Pour commander

Produit	Contenu	N° cat.
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit (24)	Pour 24 réactions : standards pour le gène contrôle ABL, standards pour le gène de fusion PML-RARA bcr1, mélange sonde et amorces pour ABL, mélange sonde et amorce pour le gène de fusion PML-RARA bcr1	672123
Rotor-Gene Q MDx — Pour analyse PCR en temps réel validée pour le diagnostic in vitro 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> PML-RARA bcr1 Controls Kit (Kit de témoins <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1) — Pour la validation qualitative des extractions d'ARN et la transcription inverse du gène de fusion PML-RARA bcr1		

Produit	Contenu	N° cat.
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit	Lignées cellulaires caractérisées par une expression négative, élevée et faiblement positive du gène de fusion PML-RARA bcr1	672091 *

*Le kit de contrôles *ipsogen* PML-RARA bcr1, n° de réf. 672091, est réservé aux travaux de recherches. Ne pas utiliser dans les procédures diagnostiques. Aucune allégation ou déclaration n'est censée être utilisée pour fournir des informations pour le diagnostic, la prévention ou le traitement d'une maladie.

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 demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou du distributeur local.

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® (QIAGEN Group) ; ABI PRISM®, Applied Biosystems®, 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 pour le kit *Ipsogen* PML-RARA bcr1

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du produit consent aux conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans ce 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 les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour des utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu pour responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
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-1358-005 1108718 Nov-2017 © 2013-2017 QIAGEN, tous droits réservés.

