

# Manual del kit *ipsogen*<sup>®</sup> WT1 *ProfileQuant*<sup>®</sup> (ELN\*)



Versión 1

IVD

Diagnóstico in vitro cuantitativo

Para utilizar con los instrumentos Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT SDS, Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Real-Time PCR System y LightCycler<sup>®</sup>



REF

676923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R2

MAT

1072503ES

**ELN** LeukemiaNet<sup>®</sup>  
European



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

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

QIAGEN sienta las bases de excelencia en los siguientes campos:

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

Nuestra misión es ayudarle a superar sus retos y a alcanzar un éxito excepcional. Para más información, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Contenido

<b>Uso previsto</b>	<b>4</b>
<b>Resumen y descripción</b>	<b>4</b>
<b>Principios del procedimiento</b>	<b>5</b>
<b>Materiales suministrados</b>	<b>9</b>
Contenido del kit	9
<b>Materiales necesarios pero no suministrados</b>	<b>10</b>
<b>Advertencias y precauciones</b>	<b>11</b>
Precauciones generales	11
<b>Almacenamiento y manipulación de los reactivos</b>	<b>12</b>
<b>Procedimiento</b>	<b>13</b>
Preparación del ARN de las muestras	13
Protocolo: Transcripción inversa normalizada recomendada conforme al programa EAC	13
Protocolo: qPCR en un instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o Rotor-Gene Q 5plex HRM con rotor para 72 tubos	16
Protocolo: qPCR en los instrumentos ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System y LightCycler 480	20
Protocolo: qPCR en el instrumento LightCycler 1.2	25
<b>Interpretación de los resultados</b>	<b>29</b>
Principio de análisis de los datos	29
Resultados	30
Guía de resolución de problemas	31
<b>Control de calidad</b>	<b>35</b>
<b>Limitaciones</b>	<b>35</b>
<b>Características del rendimiento</b>	<b>36</b>
Estudios no clínicos	36
Estudios clínicos	38
<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>41</b>
<b>Símbolos</b>	<b>42</b>
<b>Información de contacto</b>	<b>43</b>
<b>Información para pedidos</b>	<b>44</b>

## Uso previsto

El kit *ipsogen* WT1 ProfileQuant está indicado para la cuantificación de transcritos del gen del tumor de Wilms (WT) en ARN total aislado de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA). Los resultados obtenidos están destinados a facilitar el seguimiento de la respuesta temprana al tratamiento y la enfermedad residual mínima (ERM).

## Resumen y descripción

Los protocolos actuales de tratamiento para la leucemia mieloide aguda (LMA) se basan en factores pronósticos, que contribuyen a la estratificación del tratamiento (1, 2). Entre los factores pronósticos más importantes identificados hasta ahora se encuentran características previas al tratamiento tales como la edad y el recuento de leucocitos, así como el cariotipo del paciente y la presencia de mutaciones genómicas específicas tales como las de los genes FLT3 y NPM1 (3, 4). La respuesta morfológica a la quimioterapia de inducción proporciona otro factor predictivo, que se ha incorporado a los esquemas actuales de estratificación del riesgo utilizados para sustentar las decisiones con respecto al tratamiento de consolidación, especialmente el trasplante alogénico (5). Aunque estos parámetros distinguen grupos de pacientes con riesgos de recidiva claramente diferentes, existe una necesidad urgente de mejorar la estratificación del riesgo para identificar con mayor fiabilidad a los pacientes que tienen más (o menos) probabilidad de beneficiarse de un trasplante. Diversos estudios han resaltado la capacidad que tiene el seguimiento de la ERM mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en tiempo real para detectar dianas específicas de la leucemia, es decir, transcritos de genes de fusión (GF) tales como PML-RARA, CBFB-MYH11 y AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1), o mutaciones en genes específicos tales como NPM1. Esto permite identificar a los pacientes con un riesgo alto de recidiva y, por consiguiente, señala a los candidatos para una intervención terapéutica precoz (6).

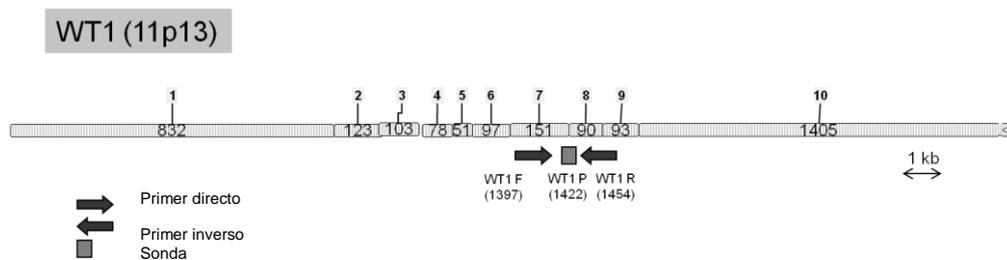
Aproximadamente la mitad de los pacientes con LMA carece de una diana apropiada específica de la leucemia, y ha existido un considerable interés en el desarrollo de estrategias alternativas que permitan aplicar el seguimiento de la ERM a una proporción mucho mayor de pacientes. Una estrategia consiste en el uso de la citometría de flujo para identificar y vigilar fenotipos aberrantes asociados a la leucemia, pero esta estrategia, aunque tiene una amplia capacidad de aplicación, es técnicamente complicada (6). Otra estrategia consiste en el uso de la qPCR para detectar transcritos que presentan una sobreexpresión elevada en los blastocitos de la LMA en comparación con la sangre y la médula ósea normales, con gran atención al gen *WT1* (6).

El gen *WT1* se encuentra situado en el brazo corto del cromosoma 11 (11p13), codifica un factor de transcripción con dominio de dedo de cinc y fue

originalmente identificado por su implicación en la patogenicidad del tumor de Wilms (7). Se ha demostrado que el gen *WT1* presenta una expresión elevada en varios tumores hematopoyéticos como la LMA (7, 8). Aunque sigue disponiéndose de escasa información sobre los mecanismos que causan la sobreexpresión de *WT1*, este fenómeno puede aprovecharse como marcador que indica la presencia, persistencia o reaparición de una hematopoyesis leucémica.

## Principios del procedimiento

La técnica de qPCR permite la cuantificación exacta de los productos de la PCR durante la fase exponencial del proceso de amplificación con PCR. Es posible obtener rápidamente datos de la qPCR, sin necesidad de un procesamiento posterior a la PCR, mediante la detección en tiempo real de señales fluorescentes durante los ciclos de PCR y después de estos, reduciendo así considerablemente el riesgo de contaminación con productos de la PCR. Actualmente se dispone de 3 tipos principales de técnicas de qPCR: análisis de qPCR con el colorante SYBR® Green I, análisis de qPCR con sondas de hidrólisis y análisis de qPCR con sondas de hibridación.



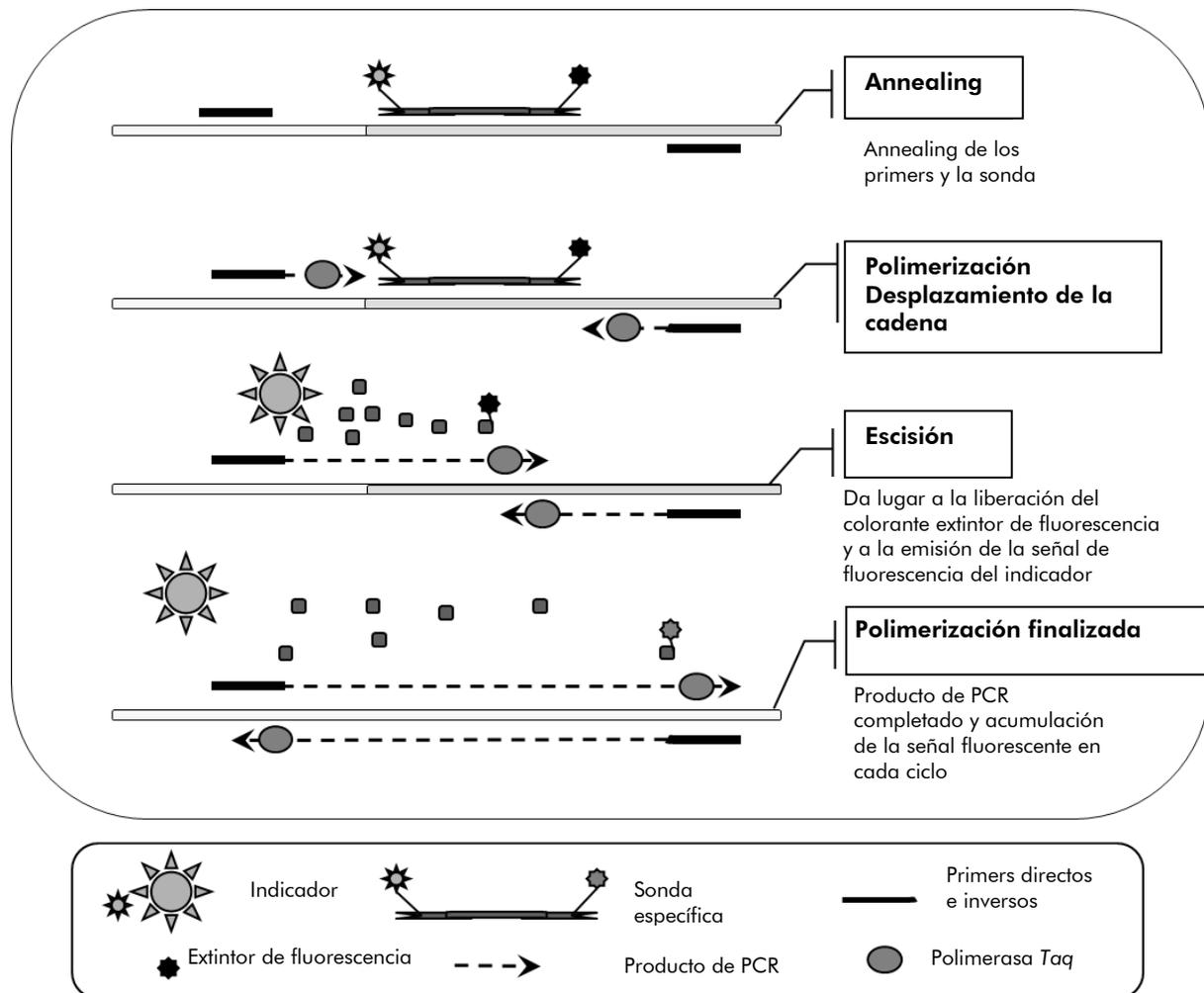
**Figura 1. Diagrama esquemático del transcrito de *WT1* cubierto por el conjunto de primers y sonda de qPCR ELN: WT1-ELN F–WT1-ELN P–WT1-ELN R.** El número mostrado debajo de los primers y de la sonda hace referencia a su posición nucleotídica en el transcrito del gen normal. El exón 5 puede ser objeto de corte y empalme alternativo.

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

Durante la PCR, si la diana que nos interesa está presente, la sonda hibrida específicamente entre el primer directo y el inverso. La actividad exonucleasa

5'→3' de la ADN-polimerasa escinde la sonda entre el indicador y el extintor de fluorescencia únicamente si la sonda se hibrida con la diana. A continuación, los fragmentos de la sonda se separan de la diana y continúa la polimerización de la cadena. Se bloquea el extremo 3' de la sonda para impedir la extensión de la sonda durante la PCR (figura 2). Este proceso ocurre en todos los ciclos y no interfiere en la acumulación exponencial del producto.

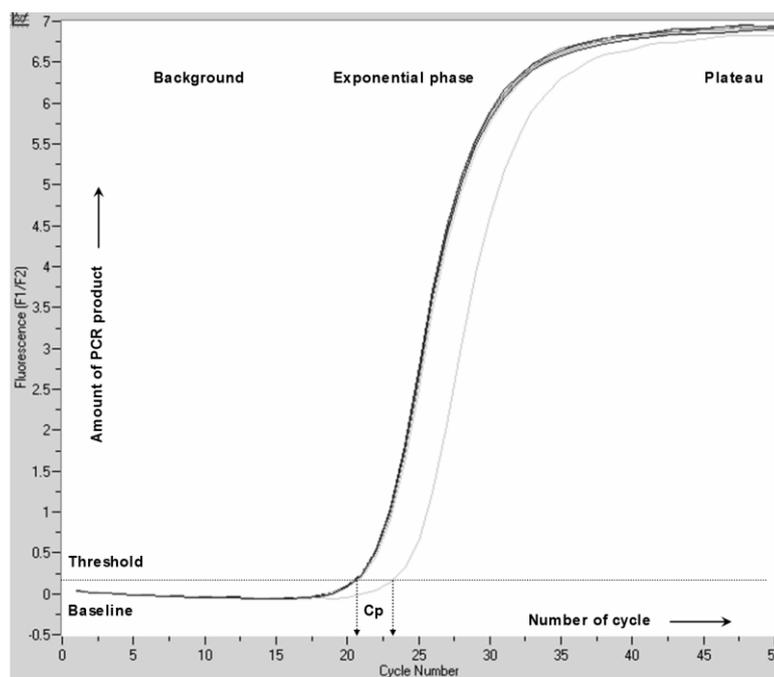
El aumento de la señal de fluorescencia se detecta únicamente si la secuencia diana es complementaria a la sonda y, por consiguiente, se amplifica durante la PCR. Debido a estos requisitos, no se detecta una amplificación inespecífica. Por tanto, el aumento de la fluorescencia es directamente proporcional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



**Figura 2. Principio de la reacción.** El ARN total se somete a transcripción inversa y el ADNc generado se amplifica mediante PCR utilizando un par de primers específicos y una sonda interna de doble colorante específica (FAM™–TAMRA™). La sonda se une al amplicón durante cada paso de annealing de la PCR. Cuando Taq se extiende desde el primer unido al amplicón, desplaza el extremo 5' de la sonda, que a continuación es degradada por la actividad exonucleasa 5'→3' de la ADN-polimerasa Taq. La escisión continúa hasta que la sonda restante se separa del amplicón. Este proceso libera el fluoróforo y el extintor de fluorescencia a la solución, separándolos espacialmente y produciendo un aumento de la fluorescencia procedente del colorante FAM y una disminución de la fluorescencia procedente del colorante TAMRA.

En la figura 3 se muestra la acumulación del producto de la PCR mediante la representación gráfica de la fluorescencia con respecto al número de ciclo. Esta curva de amplificación está compuesta sucesivamente de una fase de fondo temprana (por debajo del nivel de detección del instrumento), una fase exponencial (o fase logarítmica) y una fase de meseta. La determinación cuantitativa más precisa únicamente puede realizarse durante la fase exponencial. El primer ciclo en el que el instrumento puede distinguir la fluorescencia generada por la amplificación por encima de la señal de fondo se denomina ciclo umbral ( $C_T$ ) o ( $C_P$ , *crossing point*). Seleccionando el umbral dentro de la fase logarítmica-lineal, es posible calcular la cantidad real de moléculas iniciales de partida, ya que la intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto de la PCR en la fase exponencial.

Durante la fase de meseta no tiene lugar un aumento significativo de la cantidad de producto de la PCR. Esto se debe principalmente al agotamiento de los componentes de la PCR y al re-annealing de las cadenas del producto de la PCR causada por la elevada concentración de productos finales, lo cual impide que continúe la hibridación de los primers.



**Figura 3. Adquisición de fluorescencia durante los ciclos y las fases sucesivas de la amplificación.**

El método más directo y preciso para analizar datos cuantitativos es utilizar una curva patrón que se prepara a partir de una serie de diluciones del molde de control de concentración conocida. Este proceso recibe el nombre de "curva patrón" o cuantificación "absoluta". Tras la amplificación de la serie de diluciones patrón, se genera la curva patrón representando gráficamente el logaritmo del número de copias del molde inicial con respecto al  $C_P$  generado

para cada dilución. La representación gráfica de estos puntos genera una curva patrón. El uso de la ecuación de esta curva patrón permite determinar el número de copias inicial de las muestras que se va a cuantificar.

El kit WT1 ProfileQuant (ELN) incluye plásmidos y mezclas de primers y sondas específicos para WT1 y ABL. Estos componentes se han validado conjuntamente en el contexto de un estudio de colaboración dirigido por un grupo de expertos del consorcio European Leukemia Net. El ensayo previamente publicado por Van Dijk y colaboradores tuvo un rendimiento sistemáticamente superior al de los otros ensayos y tiene menor propensión a las mutaciones de la LMA debido a su configuración (9). Por este motivo fue elegido como ensayo ELN para WT1. El kit *ipsogen WT1 ProfileQuant* se basa en esta técnica. En este kit, se amplifica un control endógeno (transcrito de ABL) a partir de la muestra, así como el transcrito de WT1. Se proporcionan diluciones patrón seriadas del ADNc de WT1 y de control, y las curvas patrón generadas permiten el cálculo exacto del número de copias de transcritos de WT1 y de ABL en cada muestra.

# Materiales suministrados

## Contenido del kit

<b>ipsogen WT1 ProfileQuant Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>N.º de referencia</b>		<b>676923</b>
<b>Número de reacciones</b>		<b>24</b>
ABL Control Gene Standard Dilution (dilución patrón del gen de control ABL) ( $10^3$ copias/5 $\mu$ l)	C1-ABL	50 $\mu$ l
ABL Control Gene Standard Dilution (dilución patrón del gen de control ABL) ( $10^4$ copias/5 $\mu$ l)	C2-ABL	50 $\mu$ l
ABL Control Gene Standard Dilution (dilución patrón del gen de control ABL) ( $10^5$ copias/5 $\mu$ l)	C3-ABL	50 $\mu$ l
WT1 Profile Gene Standard Dilution (dilución patrón del gen de perfil WT1) ( $10^1$ copias/5 $\mu$ l)	P1-WT1	50 $\mu$ l
WT1 Profile Gene Standard Dilution (dilución patrón del gen de perfil WT1) ( $10^2$ copias/5 $\mu$ l)	P2-WT1	50 $\mu$ l
WT1 Profile Gene Standard Dilution (dilución patrón del gen de perfil WT1) ( $10^3$ copias/5 $\mu$ l)	P3-WT1	50 $\mu$ l
WT1 Profile Gene Standard Dilution (dilución patrón del gen de perfil WT1) ( $10^5$ copias/5 $\mu$ l)	P4-WT1	50 $\mu$ l
WT1 Profile Gene Standard Dilution (dilución patrón del gen de perfil WT1) ( $10^6$ copias/5 $\mu$ l)	P5-WT1	50 $\mu$ l
Primers and Probe Mix ABL (mezcla de primers y sonda para ABL)*	PPC-ABL 25x	90 $\mu$ l
Primers and Probe Mix PPP-WT1 (mezcla de primers y sonda PPP-WT1) (ELN)†	PPP-WT1 (ELN) 25x	110 $\mu$ l
ipsogen WT1 ProfileQuant Kit Handbook (inglés)		1

\* Mezcla de primers inversos y directos específicos para el gen de control (CG, control gene) ABL y una sonda FAM-TAMRA específica.

† Mezcla de primers inversos y directos específicos para el gen WT1 (exón 1-2) y una sonda FAM-TAMRA específica.

**Nota:** Centrifugar brevemente las diluciones patrón y las mezclas de primers y sonda antes de su empleo.

## Materiales necesarios pero no suministrados

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

### Reactivos

- Agua libre de nucleasas apta para PCR
- Reactivos para la transcripción inversa: el reactivo validado es Superscript® II (o Superscript) Reverse Transcriptase (transcriptasa inversa Superscript II o Superscript), que incluye un tampón de primera cadena 5x y DTT 100 mM (Life Technologies, n.º de referencia 18064-022)
- Inhibidor de ARNasa: el reactivo validado es RNaseOUT™ (Life Technologies, n.º de referencia 10777-019)
- Juego de dNTP apto para PCR
- Hexámero aleatorio
- MgCl<sub>2</sub>
- Tampón y ADN-polimerasa *Taq*: los reactivos validados son TaqMan® Universal PCR Master Mix (mezcla maestra para PCR 2x) (Life Technologies, n.º de referencia 4304437) y LightCycler TaqMan Master (mezcla maestra para PCR 5x) (Roche, n.º de referencia 04535286001)

### Consumibles

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

### Equipo

- Pipeta graduada en microlitros dedicada exclusivamente para PCR (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1.000 µl)
- Centrifugadora de mesa con rotor para tubos de reacción de 0,2 ml/0,5 ml y una velocidad máxima de 13.000-14.000 rpm
- Instrumento de PCR en tiempo real: Rotor-Gene Q 5plex HRM® u otro instrumento Rotor-Gene, LightCycler 1.2 o 480, ABI PRISM 7900HT SDS o Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System y sus correspondientes materiales específicos
- Termociclador o baño María (paso de transcripción inversa)

**Nota:** Asegúrese de que el termociclador o el baño María hayan sido verificados y calibrados siguiendo las recomendaciones del fabricante.

## Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico in vitro.

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

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

## Precauciones generales

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

Este kit está indicado para uso diagnóstico in vitro. Los reactivos y las instrucciones suministrados con este kit han sido validados para ofrecer un rendimiento óptimo. La dilución excesiva de los reactivos o un cambio en los tiempos y las temperaturas de incubación pueden causar resultados erróneos o dispares. Los reactivos PPC-ABL y PPP-WT1 podrían alterarse si se exponen a la luz. Todos los reactivos están formulados de manera específica para su utilización en este análisis. No deben sustituirse si se desea obtener un resultado óptimo del análisis.

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

Tenga la máxima precaución para evitar:

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

Por lo tanto, recomendamos lo siguiente:

- Utilizar material de laboratorio (como pipetas, puntas de pipeta, tubos de reacción) libre de nucleasas y llevar guantes cuando se realice el ensayo.
- Usar puntas de pipeta resistentes a los aerosoles nuevas en todos los pasos del pipeteo para evitar la contaminación cruzada entre las muestras y los reactivos.
- Preparar la premezcla maestra para PCR con material específico (pipetas, puntas, etc.) en una zona dedicada exclusivamente a tal fin donde no se introduzcan matrices de ADN (ADNc, ADN, plásmidos). Añadir el molde en una zona aparte (preferiblemente en una sala independiente) con material específico (pipetas, puntas, etc.).
- Manipular las diluciones patrón (C1-3 y P1-5) en una sala diferente.

## Almacenamiento y manipulación de los reactivos

Los kits se envían en nieve carbónica y deben conservarse entre  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  tras su recepción.

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

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

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

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

# Procedimiento

## Preparación del ARN de las muestras

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

## Protocolo: Transcripción inversa normalizada recomendada conforme al programa EAC

### Antes de comenzar

- Preparar dNTP, 10 mM cada uno. Conservar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en partes alícuotas.
- Preparar el hexámero aleatorio, 50 mM. Conservar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en partes alícuotas.
- Preparar  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM. Conservar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en partes alícuotas.

### Procedimiento

1. **Descongelar todos los componentes necesarios y colocarlos en hielo.**
2. **Incubar  $1\text{ }\mu\text{g}$  de ARN ( $1\text{-}4\text{ }\mu\text{l}$ ) durante 10 minutos a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y enfriar inmediatamente en hielo durante 5 minutos.**
3. **Centrifugar brevemente (durante aproximadamente 10 segundos a 10.000 rpm) para recoger el líquido en el fondo del tubo. A continuación, conservar en hielo.**
4. **Preparar la siguiente mezcla de RT según el número de muestras que vayan a procesarse (tabla 1).**

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

**Tabla 1. Preparación de la mezcla de RT.**

<b>Componente</b>	<b>Volumen por muestra (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentración final</b>
Tampón de primera cadena (suministrado con transcriptasa inversa Superscript II), 5x	4,0	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP (10 mM cada uno, que se prepararán previamente y se conservarán a -20 °C en partes alícuotas)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, suministrado con transcriptasa inversa Superscript II)	2,0	10 mM
Inhibidor de ARNasa (40 U/ $\mu$ l)	0,5	1 U/ $\mu$ l
Hexámero aleatorio (100 $\mu$ M)	5,0	25 $\mu$ M
Superscript II (200 U/ $\mu$ l)	0,5	5 U/ $\mu$ l
Muestra de ARN calentada (se añadirá en el paso 5)	1,0-4,0	50 ng/ $\mu$ l
Agua libre de nucleasas apta para PCR (se añadirá en el paso 5)	0,0-3,0	–
Volumen final	20,0	–

- 5. Pipetear 16  $\mu$ l de mezcla de RT en cada tubo para PCR. A continuación, añadir 1-4  $\mu$ l (1  $\mu$ g) de ARN (del paso 3) y enrasar a 20  $\mu$ l con agua libre de nucleasas apta para PCR (véase la tabla 2).**

**Tabla 2. Preparación de la reacción de transcripción inversa.**

<b>Componente</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>l)</b>
Mezcla de RT	16,0
Muestra de ARN calentada (1 $\mu$ g)	1,0-4,0
Agua libre de nucleasas apta para PCR	0,0-3,0
Volumen final	20,0

- 6. Mezclar bien y centrifugar brevemente (durante aproximadamente 10 segundos a 10.000 rpm) para recoger el líquido en el fondo del tubo.**
- 7. Incubar a 20 °C durante 10 minutos.**
- 8. Incubar a 42 °C en un termociclador durante 45 minutos y, a continuación, incubar inmediatamente a 99 °C durante 3 minutos.**
- 9. Enfriar en hielo (para detener la reacción) durante 5 minutos.**
- 10. Centrifugar brevemente (durante aproximadamente 10 segundos a 10.000 rpm) para recoger el líquido en el fondo del tubo. A continuación, conservar en hielo.**
- 11. Diluir el ADNc final con 30  $\mu$ l de agua libre de nucleasas apta para PCR hasta un volumen final de 50  $\mu$ l.**
- 12. Realizar la PCR conforme a los siguientes protocolos, según el instrumento de qPCR que se use.**

**Nota:** Este protocolo de transcripción inversa se desarrolló a partir de los estudios del programa "Europe Against Cancer" (EAC) (10, 11).

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

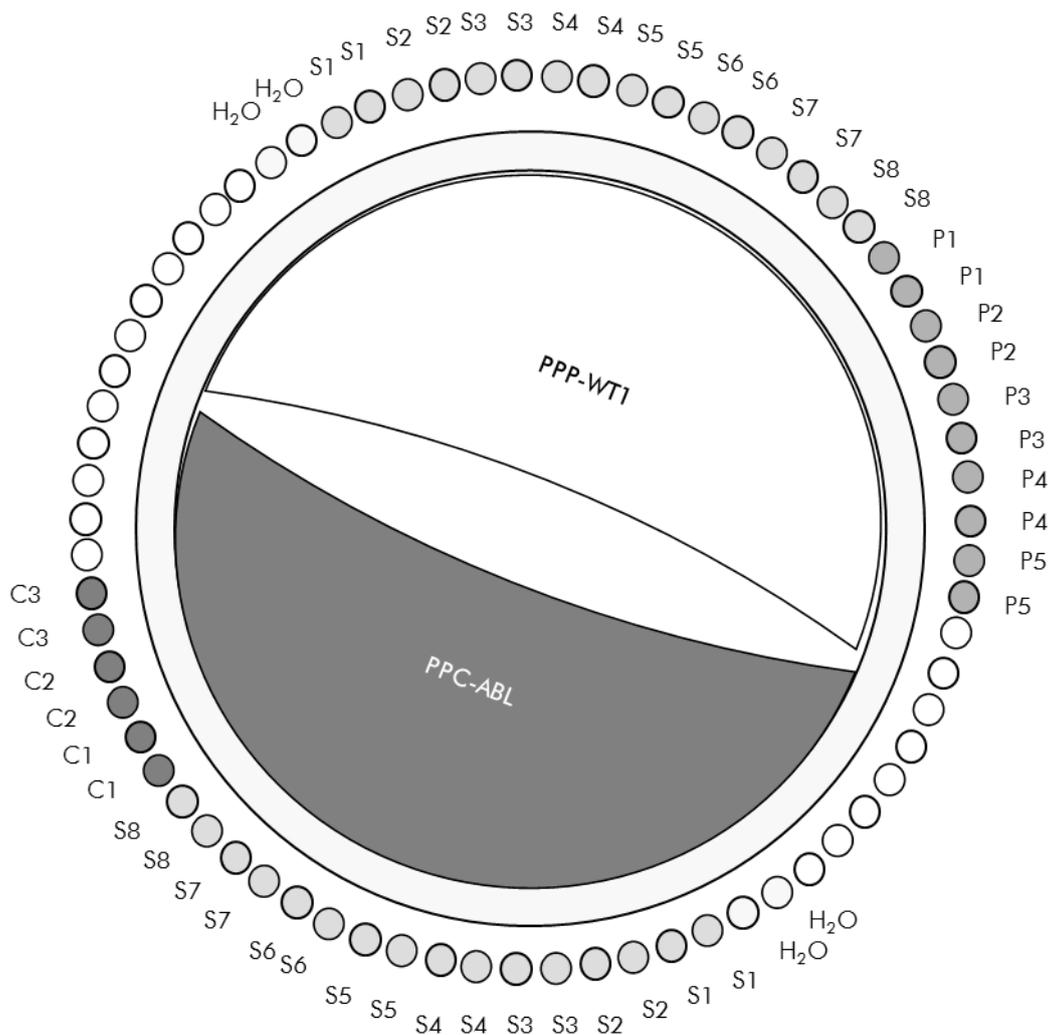
Si se emplea este instrumento, recomendamos realizar todas las mediciones por duplicado, como se indica en la tabla 3.

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

<b>Muestras</b>	<b>Reacciones</b>
<b>Con la mezcla de primers y sonda para ABL (PPC-ABL)</b>	
n muestras de ADNc	n x 2 reacciones
Patrón de ABL	2 x 3 reacciones (3 diluciones, cada una analizada por duplicado)
Control de agua	2 reacciones
<b>Con la mezcla de primers y sonda para WT1 (PPP-WT1)</b>	
n muestras de ADNc	n x 2 reacciones
Patrón de WT1	2 x 5 reacciones (5 diluciones, cada una analizada por duplicado)
Control de agua	2 reacciones

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

Recomendamos analizar 8 muestras de ADNc en el mismo experimento para optimizar el uso de los patrones y de las mezclas de primers y sonda.



**Figura 4. Configuración del rotor recomendada para cada experimento con el kit *ipsogen WT1 ProfileQuant*.** P1-5: patrones de WT1; C1-3: patrones de ABL; S: muestra de ADNc; H<sub>2</sub>O: control de agua.

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

Coloque tubos vacíos en todas las demás posiciones.

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

Nota: Realice todos los pasos en hielo.

#### Procedimiento

1. **Descongelar todos los componentes necesarios y colocarlos en hielo.**
2. **Preparar la siguiente mezcla de qPCR según el número de muestras que vayan a procesarse.**

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

En la tabla 4 se describe el esquema de pipeteo para la preparación de una mezcla de reactivos, calculado para lograr un volumen de reacción final de 25  $\mu$ l. Puede prepararse una premezcla según el número de reacciones utilizando la misma mezcla de primers y sonda (PPC-ABL o PPP-WT1). Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

**Tabla 4. Preparación de la mezcla de qPCR.**

<b>Componente</b>	<b>1 reacción (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 24 + 1 reacciones (<math>\mu</math>l)</b>	<b>WT1: 28 + 1 reacciones (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentración final</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Mezcla de primers y sonda, 25x	1,0	25,0	29,0	1x
Agua libre de nucleasas apta para PCR	6,5	162,5	188,5	–
Muestra (se añadirá en el paso 4)	5,0	5 para cada una	5 para cada una	–
Volumen total	25,0	25 para cada una	25 para cada una	–

3. Poner 20  $\mu$ l de la premezcla de qPCR por tubo.
4. Agregar 5  $\mu$ l del producto de RT (ADNc, equivalente a 100 ng de ARN) obtenido en el proceso de transcripción inversa (véase el apartado “Protocolo: Transcripción inversa normalizada recomendada conforme al programa EAC”, página 13) en el tubo correspondiente (volumen total, 25  $\mu$ l).
5. Mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo.
6. Colocar los tubos en el termociclador conforme a las recomendaciones del fabricante.
7. Programar el instrumento Rotor-Gene Q con el programa de termociclado según se indica en la tabla 5.

**Tabla 5. Perfil de temperatura.**

<b>Modo de análisis</b>	Cuantificación
<b>En espera</b>	Temperatura: 50 °C Tiempo: 2 minutos
<b>En espera 2</b>	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 minutos
<b>Ciclado</b>	50 veces 95 °C durante 15 segundos 60 °C durante 1 minuto con adquisición de fluorescencia FAM en el canal Green: Single

- 8. Para instrumentos Rotor-Gene Q, seleccionar "Slope Correct" (corrección de pendiente) para el análisis. Recomendamos fijar el umbral en 0,03. Iniciar el programa de termociclado según se indica en la tabla 5.**

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

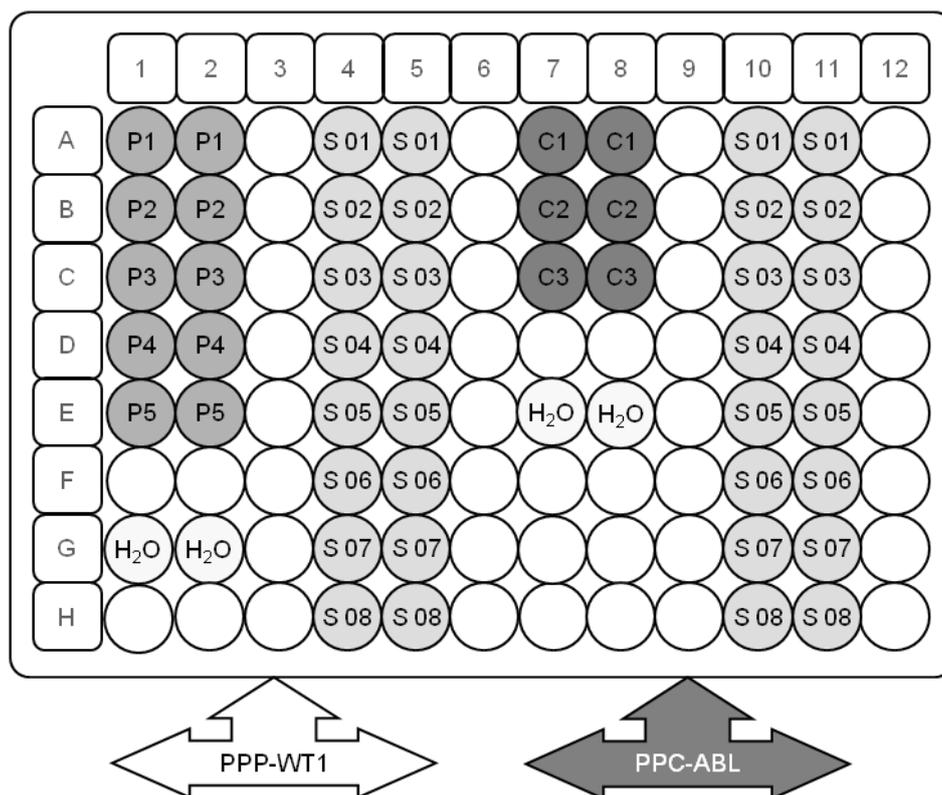
Si se emplea un equipo de qPCR con placa de 96 pocillos, recomendamos realizar todas las mediciones por duplicado, como se indica en la tabla 6.

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

<b>Muestras</b>	<b>Reacciones</b>
<b>Con la mezcla de primers y sonda para ABL (PPC-ABL)</b>	
n muestras de ADNc	n x 2 reacciones
Patrón de ABL	2 x 3 reacciones (3 diluciones, cada una analizada por duplicado)
Control de agua	2 reacciones
<b>Con la mezcla de primers y sonda para WT1 (PPP-WT1)</b>	
n muestras de ADNc	n x 2 reacciones
Patrón de WT1	2 x 5 reacciones (5 diluciones, cada una analizada por duplicado)
Control de agua	2 reacciones

## Procesamiento de las muestras en los instrumentos ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System y LightCycler 480

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



**Figura 5. Configuración de placa recomendada para un experimento.** S: muestra de ADNc; P1-5: patrones de WT1; C1-3: patrones de ABL; H<sub>2</sub>O: control de agua.

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

Nota: Realice todos los pasos en hielo.

#### Procedimiento

1. **Descongelar todos los componentes necesarios y colocarlos en hielo.**
2. **Preparar la siguiente mezcla de qPCR según el número de muestras que vayan a procesarse.**

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

En la tabla 7 se describe el esquema de pipeteo para la preparación de una mezcla de reactivos, calculado para lograr un volumen de reacción final de 25  $\mu$ l. Puede prepararse una premezcla según el número de reacciones utilizando la misma mezcla de primers y sonda (PPC-ABL o PPP-WT1). Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

**Tabla 7. Preparación de la mezcla de qPCR.**

<b>Componente</b>	<b>1 reacción (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 24 + 1 reacciones (<math>\mu</math>l)</b>	<b>WT1: 28 + 1 reacciones (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentración final</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Mezcla de primers y sonda, 25x	1,0	25,0	29,0	1x
Agua libre de nucleasas apta para PCR	6,5	162,5	188,5	–
Muestra (se añadirá en el paso 4)	5,0	5 para cada una	5 para cada una	–
Volumen total	25,0	25 para cada una	25 para cada una	–

- 3. Poner 20  $\mu$ l de la premezcla de qPCR por pocillo.**
- 4. Agregar 5  $\mu$ l del producto de RT (ADNc, equivalente a 100 ng de ARN) obtenido en el proceso de transcripción inversa (véase el apartado “Protocolo: Transcripción inversa normalizada recomendada conforme al programa EAC”, página 13) en el pocillo correspondiente (volumen total, 25  $\mu$ l).**
- 5. Mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo.**
- 6. Cerrar la placa y centrifugar brevemente (300 x g durante aproximadamente 10 segundos).**
- 7. Colocar la placa en el termociclador conforme a las recomendaciones del fabricante. Programar el termociclador con el programa de termociclado según se indica en la tabla 8 para los instrumentos ABI PRISM 7900HT SDS o Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, o según se indica en la tabla 9 para el instrumento LightCycler 480.**

**Tabla 8. Perfil de temperatura para los instrumentos ABI PRISM 7900HT SDS o Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.**

<b>Modo de análisis</b>	Curva patrón – Cuantificación absoluta
<b>En espera</b>	Temperatura: 50 °C Tiempo: 2 minutos
<b>En espera 2</b>	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 minutos
<b>Ciclado</b>	50 veces 95 °C durante 15 segundos 60 °C durante 1 minuto, con adquisición de fluorescencia FAM; extintor de fluorescencia: TAMRA

**Tabla 9. Perfil de temperatura para el instrumento LightCycler 480.**

<b>Modo de análisis</b>	Cuantificación absoluta (“Abs Quant”)
<b>Formatos de detección</b>	Seleccionar “Simple Probe” (sonda simple) en la ventana Detection formats (formatos de detección)
<b>En espera</b>	Temperatura: 50 °C Tiempo: 2 minutos
<b>En espera 2</b>	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 minutos
<b>Ciclado</b>	50 veces 95 °C durante 15 segundos 60 °C durante 1 minuto con adquisición de fluorescencia FAM correspondiente a (483-533 nm) para LC versión 01 y (465-510 nm) para LC versión 02.

**8. Para los instrumentos ABI PRISM 7900HT SDS y Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, seguir el paso 8a. Para el instrumento LightCycler 480, seguir el paso 8b.**

**8a. Instrumentos ABI PRISM 7900HT SDS y Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: recomendamos un umbral definido en 0,1,**

según se describe en el protocolo basado en el programa EAC, en el paso de análisis y una línea base definida entre los ciclos 3 y 15. Iniciar el programa de ciclado según se indica en la tabla 8.

- 8b. LightCycler 480: recomendamos el modo "Fit point analysis" (análisis del punto de ajuste) con fondo en 2,0 y umbral en 2,0. Iniciar el programa de termociclado según se indica en la tabla 9.**

## Protocolo: qPCR en el instrumento LightCycler 1.2

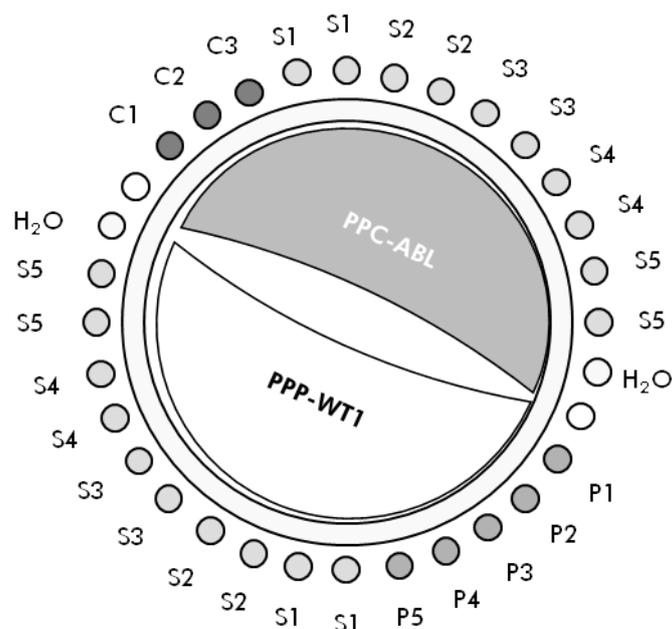
Si se emplean instrumentos para capilares, recomendamos medir las muestras por duplicado y los controles una sola vez, según se indica en la tabla 10.

**Tabla 10. Número de reacciones para el instrumento LightCycler 1.2.**

Muestras	Reacciones
<b>Con la mezcla de primers y sonda para ABL (PPC-ABL)</b>	
n muestras de ADNc	n x 2 reacciones
Patrón de ABL	1 x 3 reacciones (3 diluciones patrón, cada una analizada una sola vez)
Control de agua	1 reacción
<b>Con la mezcla de primers y sonda para WT1 (PPP-WT1)</b>	
n muestras de ADNc	n x 2 reacciones
Patrón de WT1	1 x 5 reacciones (5 diluciones patrón, cada una analizada una sola vez)
Control de agua	1 reacción

## Procesamiento de las muestras en el instrumento LightCycler 1.2

Recomendamos analizar 5 muestras de ADNc en el mismo experimento para optimizar el uso de los patrones y de las mezclas de primers y sonda. El esquema de capilares representado en la figura 6 muestra un ejemplo de un experimento.



**Figura 6. Configuración del rotor recomendada para cada experimento con el kit *ipsogen WT1 ProfileQuant*.** P1-5: patrones de WT1; **C1-3**: patrones de ABL; **S**: muestra de ADN desconocida que se va a analizar; **H<sub>2</sub>O**: control de agua.

## qPCR en el instrumento LightCycler 1.2

Nota: Debido a requisitos tecnológicos particulares, los experimentos con LightCycler tienen que realizarse con reactivos específicos. Recomendamos emplear el reactivo LightCycler TaqMan Master y seguir las instrucciones del fabricante para preparar la mezcla maestra 5x.

Nota: Realice todos los pasos en hielo.

### Procedimiento

- 1. Descongelar todos los componentes necesarios y colocarlos en hielo.**
- 2. Preparar la siguiente mezcla de qPCR según el número de muestras que vayan a procesarse.**

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

En la tabla 11 se describe el esquema de pipeteo para la preparación de una mezcla de reactivos, calculado para lograr un volumen de reacción final de 20  $\mu$ l. Puede prepararse una premezcla según el número de reacciones utilizando la misma mezcla de primers y sonda (PPC-ABL o PPP-WT1). Se incluyen volúmenes extra para compensar los errores de pipeteo.

**Tabla 11. Preparación de la mezcla de qPCR.**

<b>Componente</b>	<b>1 reacción (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 14 + 1 reacciones (<math>\mu</math>l)</b>	<b>WT1: 16 + 1 reacciones (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentración final</b>
LightCycler TaqMan Master Mix recién preparada, 5x	4,0	60,0	68,0	1x
Mezcla de primers y sonda, 25x	0,8	12,0	13,6	1x
Agua libre de nucleasas apta para PCR	10,2	153,0	173,4	–
Muestra (se añadirá en el paso 4)	5,0	5 para cada una	5 para cada una	–
Volumen total	20,0	20 para cada una	20 para cada una	–

- 3. Poner 15  $\mu$ l de la premezcla de qPCR por capilar.**
- 4. Agregar 5  $\mu$ l del producto de RT (ADNc, equivalente a 100 ng de ARN) obtenido en el proceso de transcripción inversa (véase el apartado “Protocolo: Transcripción inversa normalizada recomendada conforme al programa EAC”, página 13) en el tubo correspondiente (volumen total, 20  $\mu$ l).**
- 5. Mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo.**
- 6. Colocar los capilares en los adaptadores suministrados con el aparato y centrifugar brevemente (700 x g, durante aproximadamente 10 segundos).**
- 7. Colocar los capilares en el termociclador conforme a las recomendaciones del fabricante.**
- 8. Programar el instrumento LightCycler 1.2 con el programa de termociclado según se indica en la tabla 12.**

**Tabla 12. Perfil de temperatura.**

<b>Modo de análisis</b>	Cuantificación
<b>En espera</b>	Temperatura: 95 °C Tiempo: 10 minutos Rampa: 20
<b>Ciclado</b>	50 veces 95 °C durante 10 segundos; rampa: 20 60 °C durante 1 minuto; rampa: 20; con adquisición de fluorescencia FAM: Single
<b>En espera 2</b>	45 °C durante 1 minuto; rampa: 20

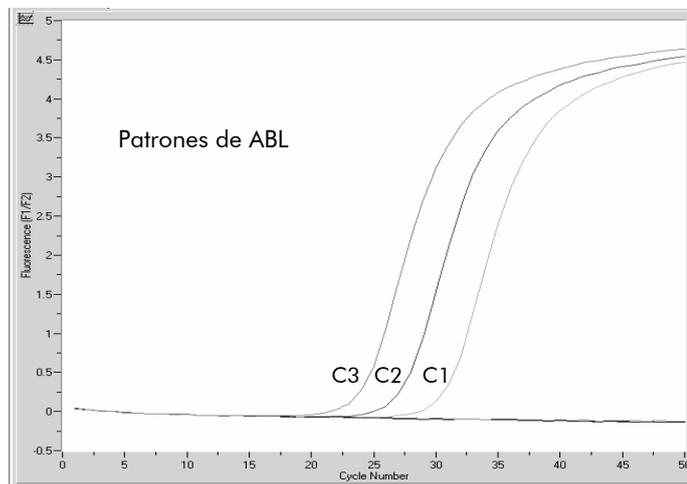
9. Para el instrumento LightCycler 1.2 se recomienda el modo F1/F2 y "2<sup>nd</sup> derivative analysis" (análisis de la segunda derivada). Iniciar el programa de termociclado según se indica en la tabla 12.

# Interpretación de los resultados

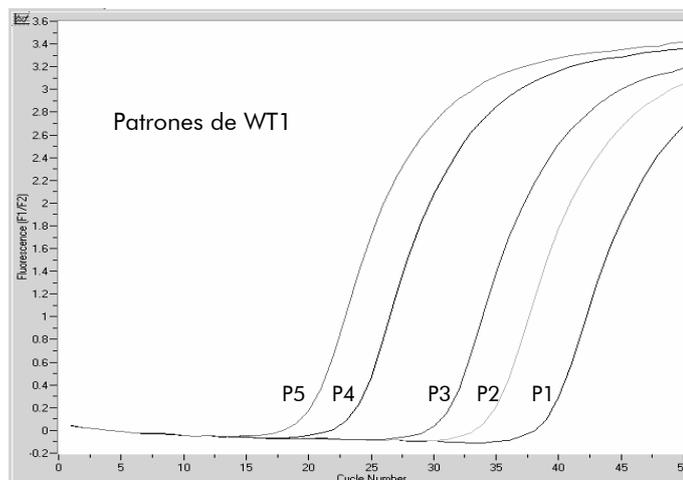
## Principio de análisis de los datos

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

Utilizando patrones con un número conocido de moléculas es posible establecer una curva patrón y determinar la cantidad precisa de diana presente en la muestra de ensayo. Las curvas patrón de *ipsogen* están basadas en plásmidos y utilizan 3 diluciones patrón de plásmidos para el gen de control (CG) ABL y 5 diluciones patrón para el gen WT1 para garantizar la obtención de curvas patrón precisas. Las figuras 7 y 8 presentan un ejemplo de curvas de amplificación TaqMan obtenidas con el kit *ipsogen* WT1 ProfileQuant.



**Figura 7. Detección de patrones de ABL (C1, C2, C3).**  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  copias/ $5 \mu\text{l}$ .



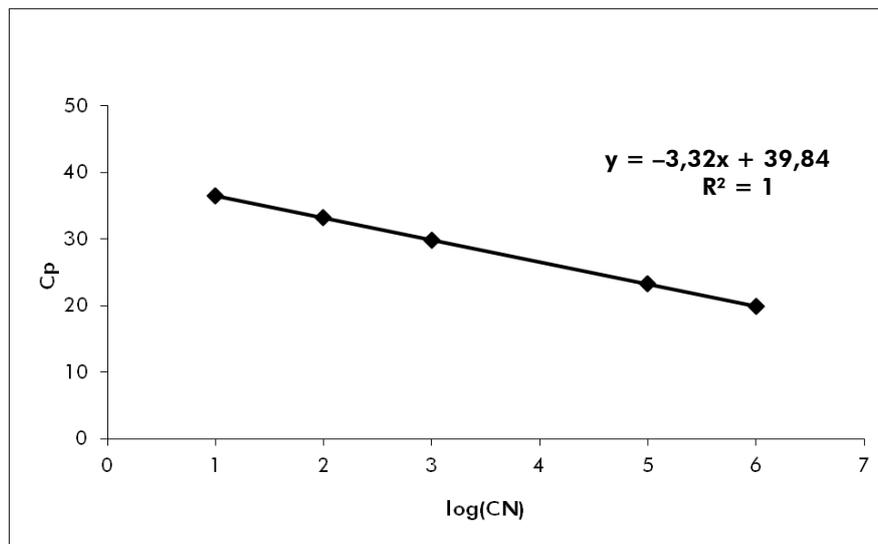
**Figura 8. Detección de patrones de WT1 (P1-P5).**  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  copias/ $5 \mu\text{l}$ .

## Resultados

### Curva patrón y criterios de calidad

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

Para cada gen (ABL y WT1), los valores brutos de  $C_p/C_T$  obtenidos con las diluciones patrón de plásmidos se representan en un gráfico según el logaritmo del número de copias (3, 4 y 5 para C1, C2 y C3; 1, 2, 3, 5 y 6 para P1, P2, P3, P4 y P5). La figura 9 muestra un ejemplo de la curva teórica calculada con 5 diluciones patrón.



**Figura 9. Curva teórica calculada con 5 diluciones patrón.** Se calcula una curva de regresión lineal ( $y = ax + b$ ) para cada gen (ABL y WT1), en la que "a" es la pendiente de la línea y "b" es la ordenada en el origen, que es la coordenada y del punto en el que la línea cruza el eje de ordenadas (eje y). Su ecuación y su coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se imprimen en el gráfico.

Dado que los patrones corresponden a diluciones de 10 veces, la pendiente teórica de la curva es  $-3,32$ . Una pendiente entre  $-3,0$  y  $-3,9$  es aceptable siempre que  $R^2$  sea  $> 0,95$  (12). Sin embargo, es deseable un valor de  $R^2 > 0,98$  para que los resultados sean precisos (13).

### Número de copias normalizado (NCN)

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

$$\text{Log}_{10} ABL_{CN} \text{ de la muestra} = \frac{\text{Valor medio de } ABL_{C_p} \text{ - ordenada en el origen de la curva patrón de ABL}}{\text{Pendiente de la curva patrón de ABL}}$$

La ecuación de la curva patrón de WT1 debe emplearse para transformar los valores brutos de  $C_p$  (obtenidos con PPP-WT1) de las muestras desconocidas en números de copias del gen WT1 ( $WT1_{CN}$ ).

$$\text{Log}_{10} WT1_{CN} \text{ de la muestra} = \frac{\text{Valor medio de } WT1C_p \text{ – ordenada en el origen de la curva patrón de WT1}}{\text{Pendiente de la curva patrón de WT1}}$$

El cociente de estos valores de CN constituye el número de copias normalizado (NCN) por 10.000 copias de ABL:

$$\text{NCN} = \frac{WT1_{CN}}{ABL_{CN}} \times 10.000$$

### **Control de calidad de los valores de ABL**

La baja calidad del ARN o la aparición de problemas durante los pasos de la qPCR dan lugar a valores bajos de  $ABL_{CN}$ . Recomendamos desechar los resultados de las muestras que den valores de  $ABL_{CN} < 4.246$ .

### **Reproducibilidad entre duplicados**

La variación en los valores de  $C_p$  entre los duplicados debe ser  $< 2$ , que corresponde a un cambio de 4 veces en los valores del número de copias.

La variación en los valores de  $C_p$  entre los duplicados suele ser  $< 1,5$  si el valor medio de  $C_p$  de los duplicados es  $< 36$  (12).

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

### **Controles de agua**

Los controles negativos deben dar un valor de CN de cero para ABL y WT1.

Un valor positivo del control de agua es consecuencia de una contaminación cruzada. Consulte el apartado “Guía de resolución de problemas”, más adelante, para encontrar una solución.

### **Guía de resolución de problemas**

Esta guía de resolución de problemas le será de utilidad para resolver los problemas que puedan surgir. Para obtener más información, consulte también la página de preguntas frecuentes de nuestro Centro de Soporte Técnico:

[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Los científicos del Servicio Técnico de QIAGEN estarán siempre encantados de responder a cualquier pregunta que pueda usted tener sobre la información y el protocolo de este manual, así como sobre las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en el apartado “Información de contacto”, página 43).

### **Comentarios y sugerencias**

---

#### **Resultado negativo para el gen de control (ABL) y WT1 en todas las muestras; patrón correcto**

- |  |  |
|--|--|
| a) Baja calidad del ARN                    | Verificar siempre la calidad y la concentración del ARN antes de empezar.<br><br>Procesar en paralelo un control positivo del ARN de la línea celular. |
| b) Fallo del paso de transcripción inversa | Verificar siempre la calidad y la concentración del ARN antes de empezar.<br><br>Procesar en paralelo un control positivo del ARN de la línea celular. |

#### **Resultado negativo para el gen de control (ABL) en las muestras; patrón correcto**

- |  |  |
|--|--|
| a) Baja calidad del ARN                    | Verificar siempre la calidad y la concentración del ARN antes de empezar.<br><br>Procesar en paralelo un control positivo del ARN de la línea celular. |
| b) Fallo del paso de transcripción inversa | Verificar siempre la calidad y la concentración del ARN antes de empezar.<br><br>Procesar en paralelo un control positivo del ARN de la línea celular. |

#### **Señal negativa del patrón**

- |                     |  |
|---------------------|--|
| a) Error de pipeteo | Revisar el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción.<br><br>Repetir la serie de PCR. |
|---------------------|--|

## Comentarios y sugerencias

---

- b) Almacenamiento incorrecto de los componentes del kit
- Conservar el kit *ipsogen* WT1 ProfileQuant entre  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y mantener las mezclas de primers y sonda (PPC y PPP) protegidas de la luz. Véase el apartado "Almacenamiento y manipulación de los reactivos", página 12.
- Evitar la congelación y descongelación repetidas.
- Dividir los reactivos en partes alícuotas para su conservación.

### Los controles negativos dan positivo

- Contaminación cruzada
- Sustituir todos los reactivos críticos.
- Repetir el experimento con nuevas partes alícuotas de todos los reactivos.
- Manipular siempre las muestras, los componentes del kit y los consumibles según las prácticas habitualmente aceptadas para evitar la contaminación por arrastre.

### Ausencia de señal, incluso en los controles patrón

- a) Error de pipeteo u omisión de reactivos
- Revisar el esquema de pipeteo y la configuración de la reacción.
- Repetir la serie de PCR.
- b) Efectos inhibidores del material de la muestra causados por una purificación insuficiente
- Repetir la preparación del ARN.
- c) LightCycler: Se ha seleccionado un canal de detección incorrecto
- Fijar el ajuste del canal en F1/F2 o 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: No se ha programado la adquisición de datos
- Comprobar los programas del ciclo.
- Seleccionar el modo de adquisición "single" al final de cada segmento de annealing del programa de PCR.

## Comentarios y sugerencias

---

### Ausencia de señal o señal baja en las muestras, pero los controles patrón son correctos

- a) Baja calidad o baja concentración del ARN      Verificar siempre la calidad y la concentración del ARN antes de empezar.  
Procesar en paralelo un control positivo del ARN de la línea celular.
- b) Fallo del paso de transcripción inversa      Verificar siempre la calidad y la concentración del ARN antes de empezar.  
Procesar en paralelo un control positivo del ARN de la línea celular.

### Intensidad de fluorescencia demasiado baja

- a) Almacenamiento incorrecto de los componentes del kit      Conservar el kit *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* entre  $-15\text{ °C}$  y  $-30\text{ °C}$  y mantener las mezclas de primers y sonda (PPC y PPP) protegidas de la luz. Véase el apartado "Almacenamiento y manipulación de los reactivos", página 12.  
Evitar la congelación y descongelación repetidas.  
Dividir los reactivos en partes alícuotas para su conservación.
- b) Cantidad inicial de ARN diana muy baja      Aumentar la cantidad de ARN de la muestra.  
Nota: Dependiendo del método seleccionado para la preparación del ARN pueden producirse efectos inhibidores.

## Comentarios y sugerencias

---

### LightCycler: La intensidad de la fluorescencia varía

- a) Error de pipeteo La variabilidad causada por el llamado "error de pipeteo" puede reducirse analizando los datos en el modo F1/F2 o 530 nm/640 nm.
- b) Centrifugación insuficiente de los capilares Es posible que la mezcla de PCR preparada siga en el extremo superior del capilar o que haya una burbuja de aire atrapada en la punta del capilar.  
Centrifugar siempre los capilares cargados con la mezcla de reacción según se describe en el manual de uso específico del aparato.
- c) Superficie externa de la punta del capilar sucia Utilizar siempre guantes cuando se manipulen los capilares.

### LightCycler: Error de la curva patrón

- Error de pipeteo La variabilidad causada por el llamado "error de pipeteo" puede reducirse analizando los datos en el modo F1/F2 o 530 nm/640 nm.

## Control de calidad

El kit completo se ha sometido a un control de calidad en un instrumento LightCycler 480. Este kit se ha fabricado con arreglo a la norma ISO 13485:2003. Los certificados de análisis pueden solicitarse en [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Limitaciones

Antes de utilizar este dispositivo, los usuarios deberán recibir la formación pertinente y estar familiarizados con esta tecnología. Este kit debe utilizarse siguiendo las instrucciones recogidas en este manual y con uno de los instrumentos validados mencionados en el apartado "Materiales necesarios pero no suministrados", página 10.

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

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

Nota: El kit se ha diseñado conforme a los estudios de la “European LeukemiaNet” (ELN) (10, 11). Debe utilizarse siguiendo las instrucciones recogidas en este manual, junto con reactivos e instrumentos validados. Cualquier uso no autorizado de este producto o modificación de los componentes eximirá a QIAGEN de cualquier responsabilidad.

## **Características del rendimiento**

### **Estudios no clínicos**

#### **Materiales y métodos**

Se realizaron estudios de linealidad con 14 muestras; cada una de ellas se obtuvo de una mezcla diferente de ARN extraído de muestras de una línea celular de alta expresión y de muestras de donantes sanos que presentaban un nivel bajo de expresión del gen WT1. Cada muestra se analizó por triplicado. En cuanto al NCN, los valores variaban entre 2,20 y 3.838,11 NCN, y este estudio mostró que el kit *ipsogen* WT1 ProfileQuant proporcionó resultados lineales en este intervalo de valores.

#### **Precisión**

Se realizó un estudio de precisión con 4 muestras; cada una de ellas se obtuvo de una mezcla diferente de ARN extraído de líneas celulares con una expresión alta y baja de WT1. Estos ensayos se repitieron un máximo de 16 veces para cada muestra. Los datos analíticos se resumen en las tablas siguientes.

**Tabla 13. Datos analíticos del estudio de precisión: plásmidos.**

	Dilución	Valor medio de $C_T$	$\sigma$	n	CV (%)
Plásmidos de WT1	P1: $10^1$ copias/5 $\mu$ l	36,13	0,87	15	2,42
	P2: $10^2$ copias/5 $\mu$ l	32,70	0,40	16	1,21
	P3: $10^3$ copias/5 $\mu$ l	29,39	0,43	16	1,45
	P4: $10^5$ copias/5 $\mu$ l	22,62	0,41	16	1,80
	P5: $10^6$ copias/5 $\mu$ l	19,25	0,38	16	1,98
Plásmidos de ABL	C1: $10^3$ copias/5 $\mu$ l	29,59	0,35	16	1,20
	C2: $10^4$ copias/5 $\mu$ l	26,11	0,40	15	1,52
	C3: $10^5$ copias/5 $\mu$ l	22,77	0,28	16	1,22

**Tabla 14. Datos analíticos del estudio de precisión: líneas celulares.**

	Dilución	Valor medio de NCN	$\sigma$	n	CV (%)
Dilución del ARN de la línea celular	10%	10.472	5598,76	16	53
	1,5%	1880	747,01	16	40
	0,05%	86	37,79	16	44
	0,0025%	3	1,90	16	57

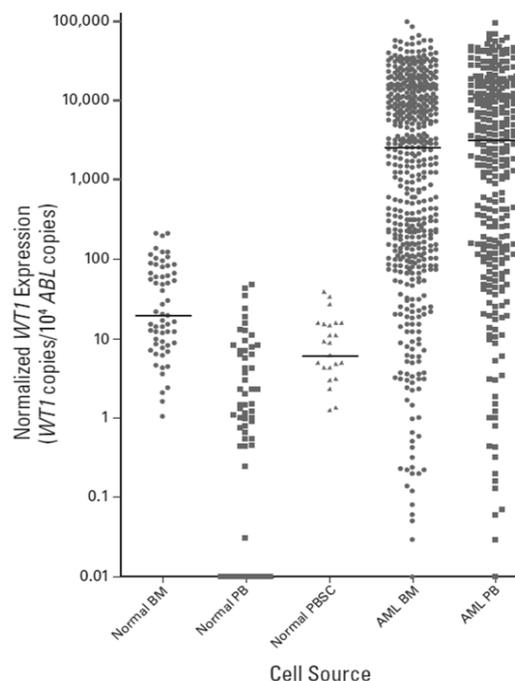
### Límite de blanco y límite de detección

El diseño del estudio se basó en recomendaciones descritas en el documento EP17-A del NCCLS, *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline* (Protocolos para la determinación de límites de detección y límites de cuantificación; norma aprobada). El nivel de fondo o límite de blanco (LOB, *limit of blank*) se determinó en muestras de sangre normales de donantes sanos (4 muestras, 73 mediciones). Se comprobó que era igual a 3,66 NCN de WT1.

El límite de detección (LOD, limit of detection), que indica la sensibilidad analítica, se determinó con muestras que tenían una expresión baja conocida de WT1 obtenidas de donantes sanos y a las que se añadieron células con un nivel de expresión alto de WT1. Esto garantizaba que el valor de NCN previsto fuera 4 veces mayor que el LOB. Se obtuvo un total de 4 muestras y se realizó un total de 72 mediciones, y el LOD obtenido fue igual a 13,08 NCN de WT1.

## Estudios clínicos

Dado que WT1 se expresa en células hematopoyéticas normales, es fundamental determinar el nivel de expresión observado en muestras de control normales para poder definir un umbral que diferencie entre la leucemia residual y la amplificación de fondo. El análisis de 204 muestras de control obtenidas de voluntarios sanos por medio del ensayo ELN utilizado en el kit *ipsogen* WT1 ProfileQuant confirmó que se observa una expresión muy baja de WT1 en muestras de sangre periférica, médula ósea y células madre de sangre periférica. La mediana fue de 19,8 copias de WT1/10<sup>4</sup> copias de ABL (intervalo 0-213) en médula ósea, 0,01 (intervalo 0,01-47,6) en sangre periférica y 6,1 (intervalo 0-39) en células madre de sangre periférica (véase la figura 10). La expresión de WT1 en sangre periférica fue significativamente más baja que en la médula ósea ( $p < 0,0001$ ). Sobre la base de estos resultados, el límite superior de la normalidad se definió como 250 NCN para la médula ósea y 50 NCN para la sangre periférica.



**Figura 10. Expresión de WT1 en muestras de donantes sanos.** Leucemia mieloide aguda (LMA); médula ósea (MO); sangre periférica (SP); células madre de sangre periférica (CMSP). (15)

Reimpreso con permiso de Cilloni D y cols.: Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European

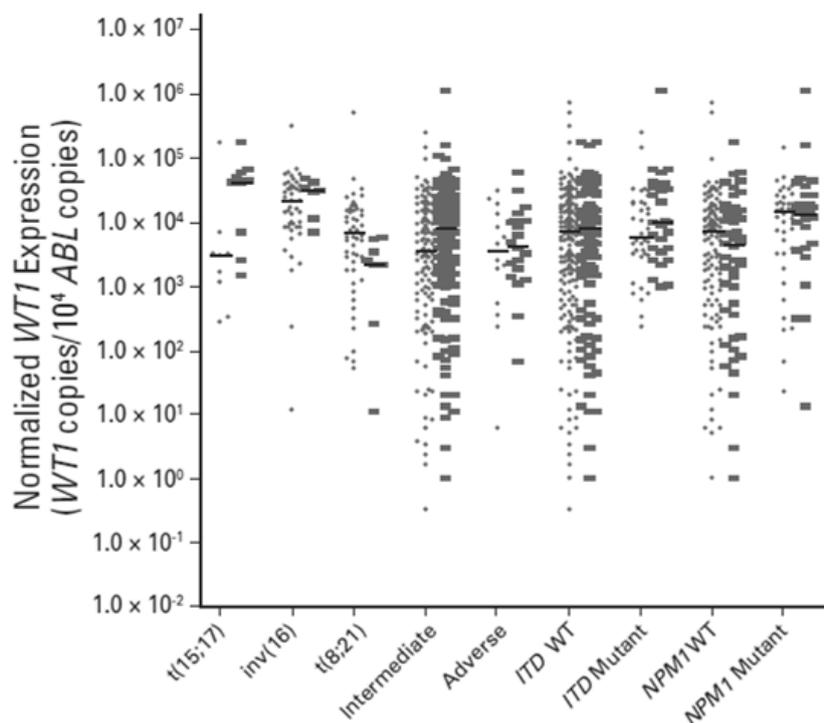
## **Definición de la expresión de WT1 mediante un ensayo de qPCR ELN normalizado en muestras de LMA previas al tratamiento**

Para evaluar la posibilidad de aplicación del ensayo ELN utilizado en el kit *ipsogen* WT1 ProfileQuant para detectar ERM, se analizaron 620 muestras previas al tratamiento (238 de sangre periférica y 382 de médula ósea) de 504 pacientes.

Se observó una sobreexpresión de WT1 por encima de los niveles de fondo (definida como  $> 250$  y  $> 50$  copias de WT1/ $10^4$  copias de ABL en la médula ósea y en la sangre periférica, respectivamente) en el 86% y en el 91% de las muestras diagnósticas de LMA de médula ósea y de sangre periférica (se muestra también en la figura 10).

La mediana del valor de copias de WT1/ $10^4$  copias de ABL fue de 2.505, (intervalo  $0-7,5 \times 10^5$ ) en la médula ósea ( $p < 0,0001$  en comparación con la médula ósea normal) y 3.107 (intervalo  $0-1,13 \times 10^6$ ) en la sangre periférica ( $p < 0,0001$  en comparación con la sangre periférica normal). No se observó una diferencia significativa en la expresión entre la sangre periférica y la médula ósea en toda la cohorte, como confirman los resultados obtenidos en pacientes con muestras diagnósticas de sangre periférica y de médula ósea emparejadas (véase Cilloni D. et al., J Clin Oncol, figura A3 del apéndice) (15).

Se observó una variación del nivel de expresión de WT1 normalizado en función de la citogenética (figura 11,  $p < 0,001$ ), con niveles especialmente altos en los casos que presentaban  $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$  (mediana  $2,31 \times 10^4$ , intervalo  $12-3,14 \times 10^5$ ). También se detectaron niveles significativamente más altos de WT1 en la LMA con mutaciones de NPM1 (NPM1 mutante: mediana  $1,44 \times 10^4$ , intervalo  $0-1,13 \times 10^6$ ; NPM1 natural: mediana 6.566, intervalo  $0-7,5 \times 10^5$ ,  $p = 0,005$ ).



**Figura 11. Variación de la expresión de WT1 en función de la citogenética (15).**

Reimpreso con permiso de Cilloni D y cols.: Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European LeukemiaNet Study: *J Clin Oncol* 27(31):5195-201, 2009. © 2009, American Society of Clinical Oncology. Reservados todos los derechos.

El nivel de expresión de WT1 definido por el ensayo ELN en 15 casos que presentaban mutaciones en los exones 7 y 9 del gen WT1 fue similar al del gen WT1 natural ( $p = 0,2$ ). Sin embargo, el análisis de secuencias de una serie de 32 casos en la que el ensayo ELN sugirió un nivel bajo de expresión del transcrito de WT1 ( $< 250$  copias/ $10^4$  copias de ABL) indicó que en 3 casos (9,4%) este bajo nivel de expresión se asoció a mutaciones que alteraban el sitio de unión del primer directo (véase Cilloni D et al., *J Clin Oncol*, figura A4 del apéndice) (15).

## Referencias bibliográficas

QIAGEN mantiene online una extensa base de datos actualizada de publicaciones científicas en las que se utilizan los productos de QIAGEN. Las exhaustivas opciones de búsqueda permiten al usuario encontrar los artículos que necesita, ya sea mediante una búsqueda sencilla con una palabra clave o especificando la aplicación, el área de investigación, el título, etc.

Para obtener una lista bibliográfica completa, visite la base de datos bibliográfica online de QIAGEN en [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) o póngase en contacto con el Servicio Técnico de QIAGEN o con su distribuidor local.

### Referencias citadas

1. Cheson, B.D. et al. (2003) Revised recommendations of the international working group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **21**, 4642.
2. Estey, E. and Döhner, H. (2006) Acute myeloid leukemia. *Lancet* **368**, 1894.
3. Grimwade D. (2001) The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* **14**, 497.
4. Schlenk, R.F. et al (2008) Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1909.
5. Wheatley, K. et al. (1999) A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. *Br. J. Haematol.* **107**, 69.
6. Freeman, S.D., Jovanovic, J.V., and Grimwade D. (2008) Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. *Semin. Oncol.* **4**, 388.
7. Sugiyama, H. (2001) Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int. J. Hematol.* **73**, 177.
8. Liu-Yin, J.. et al. (2008) Predictive value of minimal residual disease (MRD) monitoring by RQ-PCR in WT1 positive patients entered in the UK MRC AML-15 Trial. *Blood* **112**, 259.
9. Van Dijk J.P. et al. (2003) Abnormal WT1 expression in the CD34-negative compartment in myelodysplastic bone marrow. *Br. J. Haematol.* **118**, 1027.
10. 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.

11. 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.
12. 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.
13. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.
14. Cilloni, D. et al., American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, 2007.
15. Cilloni D. et al., Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized *WT1* assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet Study. *J Clin Oncol* **27**, 5195.

## Símbolos

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



Contiene reactivos suficientes para <N> reacciones



Fecha de caducidad



Producto sanitario para diagnóstico in vitro



Número de referencia



Número de lote



Número de material



Número mundial de artículo comercial



Limitación de temperatura



Fabricante



Consultar instrucciones de uso

**ELN** LeukemiaNet<sup>®</sup> European LeukemiaNet  
European

## Información de contacto

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

## Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de referencia
ipsogen WT1 ProfileQuant (24)	Para 24 reacciones: patrones del gen de control ABL, patrones del gen WT1 (exón 1-2), mezcla de primers y sonda para ABL, mezcla de primers y sonda PPP-WT1	676923
<b>Rotor-Gene Q MDx: para análisis de PCR en tiempo real validado para diagnóstico in vitro en aplicaciones clínicas</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, no se incluye la instalación y la formación	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002033

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

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.



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

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

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

Marcas comerciales: QIAGEN<sup>®</sup>, ipsogen<sup>®</sup>, ProfileQuant<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup> (QIAGEN Group); ABI PRISM<sup>®</sup>, Applied Biosystems<sup>®</sup>, FAM<sup>™</sup>, RNaseOUT<sup>™</sup>, SuperScript<sup>®</sup>, SYBR<sup>®</sup>, TAMRA<sup>™</sup> (Life Technologies Corporation); Agilent<sup>®</sup>, Bioanalyzer<sup>®</sup> (Agilent Technologies, Inc); Excel<sup>®</sup> (Microsoft Corporation); LightCycler<sup>®</sup>, TaqMan<sup>®</sup> (Roche Group).

#### **Acuerdo de licencia limitada**

La utilización de este producto implica la aceptación de los siguientes términos por parte de cualquier comprador o usuario del kit ipsogen WT1 ProfileQuant:

1. El kit ipsogen WT1 ProfileQuant puede utilizarse exclusivamente de acuerdo con el *Manual del kit ipsogen WT1 ProfileQuant* y empleando únicamente los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes contenidos en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en el *Manual del kit ipsogen WT1 ProfileQuant* y en otros protocolos disponibles en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este kit ni su(s) uso(s) no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no pueden ser reutilizados, reacondicionados ni revendidos.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones que hayan sido prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada, y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de garantía limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1355-002 © 2013-2015 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ techservice-au@qiagen.com

**Austria** ■ techservice-at@qiagen.com

**Belgium** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Brazil** ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Canada** ■ techservice-ca@qiagen.com

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

**Denmark** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Finland** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**France** ■ techservice-fr@qiagen.com

**Germany** ■ techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** ■ techservice-hk@qiagen.com

**India** ■ techservice-india@qiagen.com

**Ireland** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

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

**Luxembourg** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Mexico** ■ techservice-mx@qiagen.com

**The Netherlands** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Norway** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Singapore** ■ techservice-sg@qiagen.com

**Sweden** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Switzerland** ■ techservice-ch@qiagen.com

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

**USA** ■ techservice-us@qiagen.com

