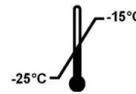


## "SensiQuant MASTER MIX"

# SensiQuant P230 MasterMix

Recherche et Dosage d'ARNm pour BCR/ABL t(9;22), variant P230

(Transcrit  $\mu$ -bcr)**REF** SQT-040For  
Research  
Use Only**INDEX**

Usage prévu	Page 1
Présentation du Kit	Page 2
Caractéristiques du Kit	Page 2
Matériel inclus dans le Kit	Page 3
Matériel nécessaire non inclus dans le Kit	Page 3
Kits accessoires	Page 4
Avertissements et précautions	Page 4
Echantillons et contrôles	Page 5
Procédure	Page 6
Limitations à la procédure	Page 13
Résolutions des problèmes	Page 15
Bibliographie	Page 16
Plan de travail (schéma)	Page 17

**USAGE PREVU**

Le kit SensiQuant P230 MasterMix s'utilise :

- ➊ Pour la **recherche qualitative** de la translocation BCR/ABL, t(9;22), chromosome *Philadelphie*, variante P230 ( $\mu$ -bcr) dans les variantes e19a2 et e19a3, dans des échantillons d'ARN total extrait de sang périphérique ou de moelle osseuse;

- ➋ Pour le **dosage quantitatif** du transcrit de la translocation BCR/ABL P230, normalisé par rapport au transcrit du gène ABL, dans des échantillons d'ARN total extrait de sang périphérique ou de moelle osseuse.

Le produit **SensiQuant P230 MasterMix** est destiné à la vérification et/ou au suivi de la présence du réarrangement BCR/ABL variant P230 dans les cas de leucémie myéloïde chronique (LMC), leucémie myéloïde aiguë (LMA) et leucémie lymphoblastique aiguë (LLA).

Le produit a été projeté en conformité avec les recommandations "Europe Against Cancer" (EAC ; Gabert et al., Leukemia 2003) et est conforme aux indications internationales actuelles (Branford et al., Leukemia 2006 ; Hugues et al., Blood 2006).

**Le produit SensiQuant P230 MasterMix est à utiliser exclusivement en association avec le kit SensiQuant P230 Standard (STD-040) ou SensiQuant P230 Positive Control (CTRL-040). Pour la réalisation d'un test de type quantitatif, toutes les dilutions fournies avec le produit SensiQuant P230 Standard doivent être utilisées ; pour l'exécution d'un test qualitatif, le seul point 10<sup>4</sup> copies/réaction de la courbe de qualification ou le SensiQuant P230 Positive Control doit être utilisé comme contrôle positif.**

Il est conseillé d'utiliser le produit en suivant les instructions reportées dans le manuel et en association avec les instruments et réactifs approuvés. Toute utilisation non prévue du produit et/ou l'altération des composants annule toute forme de responsabilité de la part de Bioclarma.

### PRESENTATION DU KIT

Le système se base sur la technologie "One-Step", au cours de laquelle la synthèse d'ADNc à partir d'un échantillon d'ARN et sa successive amplification par PCR en temps réel (Real Time PCR) ont lieu dans le même tube de réaction. Cette technique offre l'avantage de limiter les variables expérimentales en réduisant les temps et les coûts.

En outre la combinaison des différents réactifs en un système de tampon optimisé assure des résultats caractérisés par une haute sensibilité, spécificité et reproductibilité.

Le produit **SensiQuant P230 MasterMix** fournit :

- ③ la solution 20X prête à l'emploi contenant des amorces et une sonde spécifiques pour l'amplification du gène ABL domestique (**SensiQuant ABL Primers & Probe Mix**).
- ③ la solution 20X prête à l'emploi contenant des amorces et une sonde spécifiques pour l'amplification du gène BCR/ABL P230 transloqué (**SensiQuant P230 Primers & Probe Mix**).
- ③ le mélange réactionnel prêt à l'emploi pour l'amplification RT-PCR du gène domestique ABL (**SensiQuant ABL Master Mix**). Le mélange contient : tampon de réaction, ions magnésium, nucléotide triphosphate, Taq polymérase et eau.
- ③ le mélange réactionnel prêt à l'emploi pour l'amplification par RT-PCR du gène BCR/ABL P230 transloqué (**SensiQuant P230 Master Mix**). Le mélange contient : tampon de réaction, ions magnésium, nucléotide triphosphate, Taq polymérase et eau.
- ③ la solution stabilisée et prête à l'emploi de MMLV Reverse Transcriptase (**SensiQuant RT**) à ajouter aux mélanges d'amplification en RT-PCR avant chaque séance d'analyse. Ce réactif est optimisé pour fonctionner avec le protocole "One-Step", où la synthèse d'ADNc et la réaction PCR s'exécutent consécutivement dans un tube.

Le test comprend l'exécution de deux réactions sur microplaque avec un thermostat programmable équipé d'un système optique de révélation de la fluorescence (thermocycleur pour PCR en temps réel).

Dans le premier puit on effectue la réaction de transcription inverse et la successive amplification spécifique pour l'ARNm de la **variante P230** du réarrangement BCR/ABL. Dans le second puit on effectue la réaction de transcription inverse et la successive amplification de l'ARNm d'**ABL** (contrôle interne d'idoneité de l'échantillon et système de référence).

Dans chaque puits, la sonde spécifique, marquée respectivement avec les fluorophores FAM pour le transcrite P230 et HEX pour le gène contrôle ABL, est activée lorsqu'elle est hybridée avec le produit spécifique de la réaction d'amplification.

L'émission fluorescente augmente avec l'augmentation du produit spécifique de la réaction d'amplification et est mesurée et enregistrée par l'appareil. L'élaboration des données permet de déterminer la présence et le titre du transcrite ARNm de BCR/ABL P230 dans l'échantillon de départ par rapport au titre du transcrite ARNm du gène ABL de référence.

Le produit est validé sur les appareils suivants :

- Appareils Biorad : série CFX96, CFX Connect ;
- Appareils Applied Biosystems : série 7900 ;
- Appareils Qiagen Rotor-Gene Q.

Remarque: le thermocycleur Rotor-Gene Q, contrairement aux thermocycleurs équipés d'un thermobloc capable d'accueillir une microplaque 96 puits ou jusqu'à 12 barrettes de 8 puits chacune, peut être équipé d'un rotor capable d'accueillir un maximum de 72 positions (18 bandes de 4 puits chacune).

**N.B. : Les composants du kit "SensiQuant P230 Primers & Probe Mix" et "SensiQuant ABL Primers & Probe Mix" peuvent être utilisés, comme réactifs, dans la recherche et dans le dosage quantitatif absolu du transcrite pour la translocation BCR/ABL P230 et du gène ABL, en utilisant la technologie « Droplet Digital PCR » (ddPCR™ - Bio-Rad).** Pour configurer une session d'analyse avec la technologie ddPCR, reportez-vous au manuel d'utilisation fourni par le fabricant Bio-Rad.

### CARACTERISTIQUE DU KIT

Le kit **SensiQuant P230 MasterMix** doit être utilisé en association avec le kit **SensiQuant P230 Standard** ou **SensiQuant P230 Positive Control** (voir paragraphe suivant sur les kits accessoires).

**Le kit permet d'effectuer 48 déterminations au total pour l'ARNm de BCR/ABL P230 et 48 déterminations pour ABL.**

- ③ Avec les instruments **Biorad et Applied Biosystems (bloc thermique 96 positions)**: soit 24 déterminations en double pour la réaction BCR/ABL P230 (48 déterminations au total) et 24 déterminations en double pour la réaction ABL (48 déterminations au total) par run.

- Compte tenu des réactions nécessaires aux calibrateurs et aux contrôles négatifs (voir schéma à la page 7), **le nombre maximum d'échantillons cliniques pouvant être analysés avec un dosage quantitatif pour chaque kit est de 18 en une seule session.**
- Compte tenu des réactions nécessaires aux calibrateurs et aux contrôles négatifs (voir schéma page 7), **le nombre maximum d'échantillons cliniques pouvant être analysés avec un dosage qualitatif pour chaque kit est de 22 en une seule session.**

- 🔗 Avec les instruments **Qiagen Rotor-Gene Q (rotor à 72 positions)**:  
soit 18 déterminations en double pour la réaction BCR/ABL P230 (36 déterminations au total) et 18 déterminations en double pour la réaction ABL (36 déterminations au total) par run.
- Compte tenu des réactions nécessaires aux calibrateurs et aux contrôles négatifs (voir schéma page 7), **le nombre maximum d'échantillons cliniques pouvant être analysés avec un dosage quantitatif est de 12 en une seule session.**
  - Compte tenu des réactions nécessaires aux calibrateurs et aux contrôles négatifs (voir schéma page 7), **le nombre maximum d'échantillons cliniques pouvant être analysés avec un dosage qualitatif pour chaque kit est de 16 en une seule session.**

**NB. Cependant, un kit vous permet d'effectuer un total de 48 réactions pour le transcrit BCR/ABL P230 et 48 réactions pour le transcrit ABL.**

Il a été observé que :

- La **sensibilité du dosage** permet de révéler la présence d'environ 10 molécules d'ADNc cible dans les 5 µl d'échantillon ajouté à la réaction d'amplification.
- La **linéarité de la réaction** permet de déterminer une quantité d'ADNc cible comprises entre 10 et 1.000.000 de copies.

Les **données complètes des caractéristiques de performance** peuvent être demandées à l'adresse e-mail [info@bioclarma.com](mailto:info@bioclarma.com).

#### MATERIEL INCLUS DANS LE KIT

	RÉACTIF	QUANTITÉ	COMPOSITION
	<b>SensiQuant P230 Primers &amp; Probe Mix</b>	2 x 24 µl	Solution prête à l'emploi 20X d'amorces et de sondes spécifiques P230
	<b>SensiQuant P230 Master Mix</b>	2 x 335 µl	Mélange de réaction complet et prêt à l'emploi spécifique pour P230
	<b>SensiQuant ABL Primers &amp; Probe Mix</b>	2 x 24 µl	Solution prête à l'emploi 20X d'amorces et de sondes spécifiques ABL
	<b>SensiQuant ABL Master Mix</b>	2 x 335 µl	Mélange de réaction complet et prêt à l'emploi spécifique pour ABL
	<b>SensiQuant RT</b>	1 x 25 µl	Solution stabilisée et prête à l'emploi de transcriptase inverse MMLV
	<b>Acqua Ultrapura /Ultrapure water</b>	1 x 500 µl	Eau ultrapure pour biologie moléculaire

#### MATERIEL NECESSAIRE NON INCLUS DANS LE KIT

- 🔗 Hotte à flux laminaire.
- 🔗 Gant à usage unique en latex ou similaire.
- 🔗 Mélangeur vortex.
- 🔗 Microcentrifugeuse de paillasse (12.000/14.000 RPM).
- 🔗 Micropipettes et embouts stériles avec filtre pour aérosols ou à déplacement positif (0,5-10 µl, 2-20 µl, 5-50 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl).
- 🔗 Thermostat programmable avec système optique de relèvement de la fluorescence (thermocycleur pour PCR en temps réel).
- 🔗 Microplaques en plastique optiques pour PCR en temps réel approprié au bloc thermique de l'instrument utilisé et aux feuilles de scellage optique.
- 🔗 Bandes de tubes pour rotor d'instrument Rotor-Gene, bouchons relatifs et support pour le chargement de bandes.
- 🔗 Flacons stériles sans DNase RNase en 1,5 ml ou 2 ml.

### KIT ACCESSOIRES

Les **standards ADN de quantité connue** pour la réalisation de la courbe standard et la successive quantification du transcrite BCR/ABL à utiliser comme contrôle positif **ne sont pas inclus** dans ce kit. Pour exécuter ces phases de l'analyse il est conseillé d'utiliser le kit accessoire suivant produit par Bioclarma :

- ③ **SensiQuant P230 Standard (code STD-040):** ADN standard de quantité connue pour l'obtention de la courbe standard.
- ③ **SensiQuant P230 Positive Control (code CTRL-040):** ADN standard de quantité connue à utiliser comme contrôle positif.

### AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

#### ATTENTION

En cas d'accident grave, informer Bioclarma s.r.l. ([info@bioclarma.com](mailto:info@bioclarma.com); Tél. +39 01118894474) et l'organisme compétent.

**Le kit doit être utilisé à des fins de recherche uniquement.**

Les réactifs et les instructions fournis par le kit ont été approuvés pour garantir des prestations optimales. La dilution des réactifs ou l'altération des conditions expérimentales pourraient produire des résultats erronés ou discordants.

Tous les réactifs du kit sont formulés de façon spécifique pour être utilisés en association avec le kit Bioclarma **SensiQuant P230 Standard (code STD-040) et SensiQuant P230 Positive Control (CTRL-040)**.

Afin de garantir des prestations optimales au test, il est vivement déconseillé d'effectuer des substitutions.

#### Conseils spécifiques pour la manipulation :

Les procédures de biologie moléculaire, comme l'extraction, la transcription inverse, l'amplification et la révélation des acides nucléiques, requièrent du personnel formé pour éviter les risques de résultats erronés.

En particulier, porter la plus grande attention afin d'éviter :

- ③ des contaminations par des RNases/DNases qui pourrait provoquer la dégradation de l'ARNm et de l'ADNc générés;
- ③ une contamination de la PCR par des ARNm ou par transfert qui amèneraient à des résultats faux-positifs.

Il est conseillé d'adopter les **précautions** suivantes :

- Utiliser des zones séparées pour l'extraction/préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification/révélation des produits d'amplification. Ne jamais introduire un produit d'amplification dans la zone dédiée à l'extraction/préparation des réactions d'amplification;
- Utiliser des blouses, gants et instruments dédiés pour l'extraction/ préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification/ révélation des produits d'amplification. Ne jamais transférer blouses, gants et instruments/ appareils de la zone pour l'amplification/ révélation des produits d'amplification à la zone pour l'extraction/ préparation des réactions d'amplification ;
- Manipuler sous hotte à flux laminaire les échantillons qui doivent être dédiés exclusivement à ce type d'analyse;
- Eviter l'ouverture de plusieurs éprouvette à la fois;
- Manipuler les échantillons en utilisant des pipettes exclusivement dédiées à cette utilisation;
- Manipuler les réactifs sous hotte à flux laminaire. Les réactifs nécessaires à l'amplification doivent être préparés pour être utilisés en une seule session. Les pipettes utilisées pour manipuler les réactifs doivent être exclusivement dédiées à cet usage ;
- Manipuler les produits d'amplification afin de limiter au maximum leur dispersion dans l'environnement pour éviter les risques de contamination. Les pipettes utilisées pour manipuler les produits d'amplification doivent être exclusivement dédiées à cet usage ;
- Toutes les pipettes doivent être du type à distribution positive ou utiliser des embouts à filtre aérosol. Les pointes utilisées doivent être stériles, exemptes de DNase et RNase, d'ADN et d'ARN ;
- Tous les instruments, y compris les hottes à flux laminaire, les thermocycleurs et les pipettes, doivent être régulièrement calibrés et entretenus.

#### Avertissement et précautions générales :

Les tissus humains doivent être considérés comme s'ils étaient capables de transmettre des infections et donc traités avec les précautions adéquates et en conformité avec les recommandations OSHA et / ou CAP (ou équivalent pour l'UE).

- Eviter le contact direct avec les échantillons biologiques. Eviter de produire des projections ou des aérosols. Le matériel qui entre en contact avec les échantillons biologiques doit être traité avec hypochlorite de sodium dilué à 3 % pendant au moins 30 minutes ou traité en autoclave à 121° C pendant une heure avant d'être éliminé ;
- Manipuler et éliminer tous les réactifs et tous les matériels utilisés pour effectuer le dosage comme

s'ils étaient potentiellement infectés. Eviter le contact direct avec les réactifs. Eviter de produire des projections ou aérosols. Les déchets doivent être traités et éliminés selon les règles de sécurité adaptées. Le matériel à usage unique combustible doit être incinéré. Les déchets liquides contenant acides ou bases doivent être neutralisés avant leur élimination ;

- Porter des dispositifs de protection personnelle pour éviter le contact avec les yeux et la peau. Consulter la fiche technique de sécurité des matériels (MSDS) pour plus d'information ;
- Ne pas pipeter à la bouche ;
- Ne pas manger, boire, fumer ou appliquer de produits cosmétiques dans les aires de travail ;
- Bien se laver les mains après avoir manipulé les échantillons et réactifs ;
- Eliminer les réactifs en plus et les déchets selon les normes en vigueur ;
- Lire toutes les instructions fournies avec le kit avant d'effectuer le dosage ;
- S'abstenir aux instructions avec le kit pendant d'effectuer le dosage ;
- Respecter la date de péremption du kit ;
- Utiliser seulement les réactifs présents dans le kit et ceux conseillés par le producteur ;
- Ne pas échanger les réactifs provenant de lots différents. Ne pas utiliser des réactifs provenant de kits d'autres producteurs.

#### Avertissement et précautions spécifiques pour les réactifs :

Les réactifs **SensiQuant P230 MasterMix** présentent les Conseils de Prudence suivant (P): **P261** : Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.; **P262** : Eviter tout contact avec les yeux, la peau ou les vêtements.

#### Conservation :

Conserver le composant **SensiQuant RT, SensiQuant P230 Master Mix, SensiQuant ABL MasterMix, SensiQuant P230 Primers & Probe Mix e SensiQuant ABL Primers & Probe Mix** à une température constante comprise entre -25°C et -15°C.

Il est recommandé de ne pas effectuer plus **d'un cycle de congélation/décongélation**. Des cycles ultérieurs de congélation / décongélation pourraient réduire la performance du produit.

Réduire au minimum l'exposition à la lumière des composants du kit.

Conserver tous les composants du kit dans les emballages d'origine.

Mélanger délicatement et centrifuger les éprouvettes avant ouverture.

Ces conditions de conservation s'appliquent aux composants ouverts et à ceux qui ne sont pas encore ouverts. Les composants conservés dans des conditions différentes de celles spécifiées sur l'étiquette pourraient ne pas fournir des prestations correctes, et agir négativement sur les résultats du dosage.

#### Stabilité du kit :

Les dates de péremption pour chaque réactif sont reportées sur les étiquettes des composants. Le kit conserve ses prestations inaltérées jusqu'à la date de péremption reportée sur l'étiquette dans des conditions de conservation correctes.

### ECHANTILLONS ET CONTROLES

#### Nature des échantillons :

Ce produit doit être utilisé avec des échantillons d'ARN extraits de préparations biologiques suivants :

- sang périphérique prélevé en EDTA ou citrate de sodium
- moelle osseuse prélevé en EDTA ou citrate de sodium
- suspensions de lympho-monocytes et/ou de leucocytes.

Les échantillons d'ARN peuvent être préparés :

- En suivant une procédure manuelle (TRIZOL Reagent – Invitrogen, Purezol – Biorad et similaires);
- Avec un Kit d'extraction d'ARN sur colonne (RNeasy Mini Kit – Qiagen);
- Par extraction semi-automatique (Maxwell 16 – Promega).

#### Sang périphérique ou de moelle prélevé en EDTA ou citrate de sodium :

Les échantillons de sang périphérique ou de moelle, prélevé en EDTA ou en citrate de sodium doivent être prélevés selon les recommandations du laboratoire et transportés et conservés à une température comprise entre +2° et +8°C, pendant un maximum de 4 heures.

La quantité optimale de leucocytes pour l'extraction d'ARN total est d'environ 10.000.000 de cellules. Ne pas congeler le sang périphérique afin de prévenir la dégradation de l'ARN.

Suspensions de lympho-monocytes ou leucocytes :

Les suspensions de lympho-monocytes ou de leucocytes doivent être préparées selon les recommandations du laboratoire, resuspendues en solution physiologique stérile ou PBS stérile, comptées et conservées à une température comprise entre +2° et +8°C, pendant un maximum de 4 heures. La quantité optimale de leucocytes pour l'extraction d'ARN total est d'environ 10.000.000 de cellules.

Substances interférentes :

Les échantillons d'ARN total extrait ne doivent pas contenir d'héparine, d'hémoglobine ou de traces résiduelles de Ficoll™ afin d'éviter les phénomènes d'inhibition et des résultats non valides. Les effets de substances comme les antibiotiques, les médicaments antiviraux, les médicaments utilisés en chimiothérapie ou les médicaments immunosuppresseurs sur l'inhibition ne sont pas disponibles. La préparation de l'ARN à partir d'échantillons des patients doit être effectuée en suivant une procédure approuvée.

**La qualité du dosage dépend dans une large mesure de la qualité de l'ARN de départ.** Il est donc conseillé de contrôler l'ARN purifié par électrophorèse sur gel d'agarose ou en utilisant l'Agilent Bioanalyzer avant analyse.

Concentration des échantillons :

Pour chaque échantillon, le test prévoit :

- l'exécution de la réaction de transcription inverse/amplification pour le transcrit BCR/ABL (**en double**);
- l'exécution de la réaction de transcription inverse/amplification pour le transcrit ABL (**en double**).

Pour chaque réaction on peut utiliser :

- 1,5 µg d'ARN total. Dans ce cas **l'analyse complète d'un échantillon clinique requiert 6 µg d'ARN**. Diluer chaque ARN total extrait à une concentration de 0,3 µg/µl, de façon que 5 µl contiennent 1,5 µg d'ARN ;

OU

- 0,5 µg d'ARN total. Dans ce cas **l'analyse complète d'un échantillon clinique requiert 2 µg d'ARN**. Diluer chaque ARN total extrait à une concentration de 0,1 µg/µl, de façon que 5 µl contiennent 0,5 µg d'ARN ;

OU

- 0,25 µg d'ARN total. Dans ce cas **l'analyse complète d'un échantillon clinique requiert 1 µg d'ARN**. Diluer chaque ARN total extrait à une concentration de 0,05 µg/µl, de façon que 5 µl contiennent 0,25 µg d'ARN ;

Il est conseillé de prévoir plusieurs aliquots des échantillons à conserver congelés de façon à ne pas les soumettre à plusieurs cycles de congélation/décongélation.

Contrôles d'amplification :

Il est absolument obligatoire de valider chaque session d'amplification :

- avec une réaction de **contrôle négatif** et une **courbe d'étalonnage (SensiQuant P230 Standard)** s'il s'agit d'une analyse quantitative
- avec une réaction de **contrôle négatif** et une réaction de **contrôle positif (point 10<sup>4</sup> de la courbe SensiQuant P230 Standard ou SensiQuant P230 Positive Control)** s'il s'agit d'une analyse qualitative

Comme contrôle négatif, utiliser de l'eau bi-distillée stérile, éprouvette avec bouchon TRANSPARENT Eau Ultrapure, fournie avec le produit SensiQuant P230 MasterMix.

## PROCEDURE

Mise en place de la session d'amplification par PCR en temps réel (Real Time PCR) :

Avant de commencer la session il est nécessaire :

- De vérifier, en suivant la documentation de l'appareil, que le thermocycleur pour PCR en temps réel soit capable d'exciter les fluorochromes des sondes utilisées et d'en mesurer l'émission ;
- D'indiquer, en suivant la documentation de l'appareil, la position dans la microplaque des réactions, le type de fluorescence à mesurer et le type de réaction (échantillon, contrôle négatif d'amplification, standard de quantité connue). Remplir le **Plan de travail** fourni avec cette fiche technique en transcrivant ces informations. Le **Plan de travail** devra être suivi avec attention pendant le transfert du mélange réactionnel et des échantillons dans les micropuits.

Préparation du dosage QUANTITATIF

**Notez s'il vous plaît :** afin de déterminer le titre du transcrit dans l'échantillon à analyser, prévoir 2 séries de réactions avec le produit **SensiQuant P230 Standard** pour obtenir les deux courbes standard, une pour **P230 (courbe à 5 points, 10<sup>5</sup> copies/reaction, 10<sup>4</sup> copies/reaction, 10<sup>3</sup> copies/reaction, 10<sup>2</sup> copies/reaction et 10 copies/reaction)** et une pour **ABL courbe à 4 points,**

10<sup>5</sup> copies/reaction, 10<sup>4</sup> copies/reaction, 10<sup>3</sup> copies/reaction, 10<sup>2</sup> copies/reaction). Chaque point de la courbe sera fait en doublon technique.  
 Insérez dans le tableau de chargement un double contrôle négatif (eau ultra pure) fourni avec le kit.

Vous trouverez ci-dessous un exemple de la façon dont un dosage quantitatif de 18 échantillons peut être organisé sur les instruments **Biorad, Applied Biosystems et Roche**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P230 10 <sup>5</sup>	P230 10 <sup>5</sup>	C4 P230	C4 P230	C12 P230	C12 P230	ABL 10 <sup>5</sup>	ABL 10 <sup>5</sup>	C4 ABL	C4 ABL	C12 ABL	C12 ABL
B	P230 10 <sup>4</sup>	P230 10 <sup>4</sup>	C5 P230	C5 P230	C13 P230	C13 P230	ABL 10 <sup>4</sup>	ABL 10 <sup>4</sup>	C5 ABL	C5 ABL	C13 ABL	C13 ABL
C	P230 10 <sup>3</sup>	P230 10 <sup>3</sup>	C6 P230	C6 P230	C14 P230	C14 P230	ABL 10 <sup>3</sup>	ABL 10 <sup>3</sup>	C6 ABL	C6 ABL	C14 ABL	C14 ABL
D	P230 10 <sup>2</sup>	P230 10 <sup>2</sup>	C7 P230	C7 P230	C15 P230	C15 P230	ABL 10 <sup>2</sup>	ABL 10 <sup>2</sup>	C7 ABL	C7 ABL	C15 ABL	C15 ABL
E	P230 10	P230 10	C8 P230	C8 P230	C16 P230	C16 P230			C8 ABL	C8 ABL	C16 ABL	C16 ABL
F	C1 P230	C1 P230	C9 P230	C9 P230	C17 P230	C17 P230	C1 ABL	C1 ABL	C9 ABL	C9 ABL	C17 ABL	C17 ABL
G	C2 P230	C2 P230	C10 P230	C10 P230	C18 P230	C18 P230	C2 ABL	C2 ABL	C10 ABL	C10 ABL	C18 ABL	C18 ABL
H	C3 P230	C3 P230	C11 P230	C11 P230	CN P230	CN P230	C3 ABL	C3 ABL	C11 ABL	C11 ABL	CN ABL	CN ABL

P230 10<sup>5</sup>- P230 10 : Standard pour BCR / ABL P230 ; ABL 10<sup>5</sup>-ABL 10<sup>2</sup> : Standard pour ABL ; NC : contrôles négatifs ; C1-C18 : échantillons.

Vous trouverez ci-dessous un exemple de la façon dont un dosage quantitatif de 12 échantillons peut être organisé sur les instruments **Rotor-Gene Q (Qiagen)**.

1	P230 10 <sup>5</sup>	P230 10	C4 P230	C8 P230	C12 P230	ABL 10 <sup>5</sup>	C2 ABL	C6 ABL	C10 ABL
2	P230 10 <sup>5</sup>	P230 10	C4 P230	C8 P230	C12 P230	ABL 10 <sup>5</sup>	C2 ABL	C6 ABL	C10 ABL
3	P230 10 <sup>4</sup>	C1 P230	C5 P230	C9 P230	CN P230	ABL 10 <sup>4</sup>	C3 ABL	C7 ABL	C11 ABL
4	P230 10 <sup>4</sup>	C1 P230	C5 P230	C9 P230	CN P230	ABL 10 <sup>4</sup>	C3 ABL	C7 ABL	C11 ABL
5	P230 10 <sup>3</sup>	C2 P230	C6 P230	C10 P230	ABL 10 <sup>3</sup>		C4 ABL	C8 ABL	C12 ABL
6	P230 10 <sup>3</sup>	C2 P230	C6 P230	C10 P230	ABL 10 <sup>3</sup>		C4 ABL	C8 ABL	C12 ABL
7	P230 10 <sup>2</sup>	C3 P230	C7 P230	C11 P230	ABL 10 <sup>2</sup>		C5 ABL	C9 ABL	C13 ABL
8	P230 10 <sup>2</sup>	C3 P230	C7 P230	C11 P230	ABL 10 <sup>2</sup>		C5 ABL	C9 ABL	C13 ABL

P230 10<sup>5</sup>- P230 10 : Standard pour BCR / ABL P230 ; ABL 10<sup>5</sup>-ABL 10<sup>2</sup> : Standard pour ABL ; NC : contrôles négatifs ; C1-C12 : échantillons.

**Préparation du dosage QUALITATIF**

Utiliser uniquement le point 10<sup>4</sup> copies / réaction du produit SensiQuant P230 Standard ou SensiQuant P230 Positive Control comme contrôle positif qualitatif en double technique pour les réactions BCR/ABL et ABL et le contrôle négatif (eau ultrapure) fourni avec le kit.

Vous trouverez ci-dessous un exemple de la manière dont une analyse qualitative de 22 échantillons peut être organisée sur les instruments **Biorad, Applied Biosystems et Roche**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P230 10 <sup>4</sup>	P230 10 <sup>4</sup>	C8 P230	C8 P230	C16 P230	C16 P230	ABL 10 <sup>4</sup>	ABL 10 <sup>4</sup>	C8 ABL	C8 ABL	C16 ABL	C16 ABL
B	C1 P230	C1 P230	C9 P230	C9 P230	C17 P230	C17 P230	C1 ABL	C1 ABL	C9 ABL	C9 ABL	C17 ABL	C17 ABL
C	C2 P230	C2 P230	C10 P230	C10 P230	C18 P230	C18 P230	C2 ABL	C2 ABL	C10 ABL	C10 ABL	C18 ABL	C18 ABL
D	C3 P230	C3 P230	C11 P230	C11 P230	C19 P230	C19 P230	C3 ABL	C3 ABL	C11 ABL	C11 ABL	C19 ABL	C19 ABL
E	C4 P230	C4 P230	C12 P230	C12 P230	C20 P230	C20 P230	C4 ABL	C4 ABL	C12 ABL	C12 ABL	C20 ABL	C20 ABL
F	C5 P230	C5 P230	C13 P230	C13 P230	C21 P230	C21 P230	C5 ABL	C5 ABL	C13 ABL	C13 ABL	C21 ABL	C21 ABL
G	C6 P230	C6 P230	C14 P230	C14 P230	C22 P230	C22 P230	C6 ABL	C6 ABL	C14 ABL	C14 ABL	C22 ABL	C22 ABL
H	C7 P230	C7 P230	C15 P230	C15 P230	CN P230	CN P230	C7 ABL	C7 ABL	C15 ABL	C15 ABL	CN ABL	CN ABL

P230 10<sup>4</sup> : contrôle positif pour BCR / ABL P230 ; ABL 10<sup>4</sup> : contrôle positif pour ABL ; NC : contrôles négatifs ; C1-C22 : échantillons.

Vous trouverez ci-dessous un exemple de la manière dont une analyse qualitative de 16 échantillons peut être organisée sur les instruments **Rotor-Gene Q (Qiagen)**.

1	P230 10 <sup>4</sup>	C4 P230	C8 P230	C12 P230	C16 P230	C2 ABL	C6 ABL	C10 ABL	C14 ABL
2	P230 10 <sup>4</sup>	C4 P230	C8 P230	C12 P230	C16 P230	C2 ABL	C6 ABL	C10 ABL	C14 ABL
3	C1 P230	C5 P230	C9 P230	C13 P230	CN P230	C3 ABL	C7 ABL	C11 ABL	C15 ABL
4	C1 P230	C5 P230	C9 P230	C13 P230	CN P230	C3 ABL	C7 ABL	C11 ABL	C15 ABL
5	C2 P230	C6 P230	C10 P230	C14 P230	ABL 10 <sup>4</sup>	C4 ABL	C8 ABL	C12 ABL	C16 ABL
6	C2 P230	C6 P230	C10 P230	C14 P230	ABL 10 <sup>4</sup>	C4 ABL	C8 ABL	C12 ABL	C16 ABL
7	C3 P230	C7 P230	C11 P230	C15 P230	C1 ABL	C5 ABL	C9 ABL	C13 ABL	C17 ABL
8	C3 P230	C7 P230	C11 P230	C15 P230	C1 ABL	C5 ABL	C9 ABL	C13 ABL	C17 ABL

P230 10<sup>4</sup> : contrôle positif pour BCR / ABL P230 ; ABL 10<sup>4</sup> : contrôle positif pour ABL ; NC : contrôles négatifs ; C1-C16 : échantillons.

**Réglage du cycle thermique**

Régler les paramètres du cycle thermique en fonction des indications spécifiques à chaque instrument de cette section

**Sur les appareils Bio-Rad série CFX96 et CFX Connect**

Programme RQ-PCR CFX-96 Biorad		
Température	Temps	Phase
50°C	10 min	Synthèse ADNc
95°C	5 min	Inactivation de l'enzyme RT

95°C	10 s	50 cycles
60°C (*)	30 s	

(\*) Lecture de la fluorescence

Configurer :

- Modalité d'analyse : **Single Threshold**.
- Lecture fluorescence **FAM pour P230, HEX pour ABL**
- Sélectionner l'option "**baseline subtracted curve fit**" et fixer la valeur **Seuil** (Valeur de threshold) à **100**.
- Baseline Cycles : **autocalculated**
- **Volume de réaction égal à 20 µl**

**Sur les appareils Applied Biosystems : série 7900 :**

Programme RQ-PCR Série Applied Biosystem (7900)		
Température	Temps	Phase
50°C	10 min	Synthèse ADNc
95°C	5 min	Inactivation de l'enzyme RT

95°C	20 s	50 cycles
60°C (*)	1 min	

(\*) Lecture de la fluorescence

Configurer :

- Modalité d'analyse : courbe standard, quantification absolue, protocole standard ;
- Lecture fluorescence **FAM pour P230, HEX pour ABL** ;
- Passive Reference : **ROX**
- Fixer la valeur **Seuil** (Valeur de threshold) à **0,15** et fixer la **baseline entre les cycles 3 et 15**.
- **Volume de réaction égal à 20 µl**

**Sur les appareils Qiagen : Rotor-Gene Q**

Programme RQ-PCR Rotor-Gene Q Qiagen		
Température	Temps	Phase
50°C	10 min	Synthèse ADNc
95°C	5 min	Inactivation de l'enzyme RT

95°C	10 s	50 cycles
60°C (*)	30 s	

(\*) Lecture de la fluorescence

Configurer :

- Modalité d'analyse : **rotor à 72 positions**.
- **Volume de réaction égal à 20 µl**
- Lecture fluorescence : **GREEN** (qui correspond à **FAM**) pour **P230** et **YELLOW** pour **ABL**.
  - **Optimisation des Gains:**
    - Dans « Channel Setting » sélectionnez **VERT** puis « Add »; à ce point dans "**Tube position**" inscrire le numéro de la position dans le puits rotor correspondant à un point de la courbe standard (ou contrôle positif en cas d'analyse qualitative) chargé avec le mélange réactionnel P230
    - Dans "Channel Setting" sélectionnez **JAUNE** puis "Ajouter"; à ce point dans "**Tube position**" inscrire le numéro de la position dans le rotor du puits correspondant à un point de la courbe étalon (ou témoin positif en cas d'analyse qualitative) chargé avec le mélange réactionnel ABL
    - Sélectionnez "Effectuer l'optimisation avant la 1ère acquisition".
- Pendant l'analyse, réglez le seuil sur **0,05 pour FAM et HEX**

**Mise en place de l'amplification:**

Avant de commencer la session il est nécessaire de:

- Prélever et décongeler les éprouvettes avec les échantillons à analyser.
- Centrifuger les éprouvettes pendant 5 secondes pour reporter sur le fond le contenu et les mettre sur glace;
- Prélever et décongeler les éprouvettes de **SensiQuant P230 MasterMix (bouchon JAUNE)** et de **SensiQuant ABL MasterMix (bouchon BLANC)**, le contenu de chaque éprouvette est suffisant pour **24 réactions**.
- mélanger les tubes et centrifuger brièvement (5 secondes) pour remettre le contenu au fond et conserver sur glace
- prendre et décongeler les tubes de **SensiQuant P230 Master Mix (bouchon VERT)** et **SensiQuant ABL Master Mix (bouchon BLEU)**, en se rappelant que le contenu de chaque tube est suffisant pour mettre en place **24 réactions**
- mélanger délicatement en retournant les Master Mixes au moins 10 fois, en évitant de produire de la

mousse. NE PAS vortexer. Centrifuger brièvement (5 secondes) les éprouvettes pour reporter sur le fond le contenu et les mettre sur glace;

- Prélever et garder sur glace l'éprouvette **SensiQuant RT (bouchon VIOLET)** contenant l'enzyme transcriptase inverse stabilisée ; NE PAS mélanger, NE PAS vortexer le tube; Centrifuger brièvement (5 secondes) les éprouvettes pour reporter sur le fond le contenu et les mettre sur glace;
  - Prélever et décongeler les éprouvettes de **SensiQuant P230 STANDARD** nécessaire pour les courbes standard de BCR/ABL P230 et ABL ou le tube de **SensiQuant P230 Positive Control** nécessaire pour le contrôle positif.
  - Mélanger et centrifuger les éprouvettes pendant 5 secondes pour reporter sur le fond le contenu et les garder sur glace;
- 1) Préparer le "mélange de pré-réaction P230" en mélangeant ensemble **SensiQuant P230 MasterMix**, **SensiQuant P230 Primers & Probe mix** et **SensiQuant RT** comme décrit dans la table ci-dessous et pour le nombre d'échantillons à analyser:

Mélange de pré-réaction P230	Couleur de l'éprouvette	Volume pour 1 réaction (µl)
SensiQuant P230 MasterMix	VERT	13,76
SensiQuant P230 Primers & Probe Mix	JAUNE	1
SensiQuant RT	VIOLET	0,24
	<b>Vol. total</b>	<b>15</b>

Mélanger en inversant le tube 10 fois, en évitant de produire des bulles. Attention! Ne pas vortexer. Centrifuger brièvement les éprouvettes pour reporter le contenu sur le fond.

- 2) Préparer le "mélange de pré-réaction ABL" en mélangeant ensemble **SensiQuant ABL MasterMix**, **SensiQuant ABL Primers & Probe mix** et **SensiQuant RT** comme décrit dans la table ci-dessous et pour le nombre d'échantillon à analyser:

Mélange de pré-réaction ABL	Couleur de l'éprouvette	Volume pour 1 réaction (µl)
SensiQuant ABL Master mix	BLEU	13,76
SensiQuant ABL Primers & Probe Mix	BLANC	1
SensiQuant RT	VIOLET	0,24
	<b>Vol. Total</b>	<b>15</b>

Mélanger en inversant le tube 10 fois, en évitant de produire des bulles. Attention! Ne pas vortexer. Centrifuger brièvement les éprouvettes pour reporter le contenu sur le fond.

**REMARQUE:** Le tableau suivant indique les volumes pour chacun des deux mélanges de pré-réaction à préparer (respectivement «Pré-mélange de pré-réaction P230» et «Pré-réaction de mélange ABL») en fonction du nombre de réactions à préparer dans le cas d'une analyse quantitative. Il est conseillé de préparer un volume correspondant à au moins un échantillon de plus que ceux réellement analysés.

Nr d'échantillons	Nr de réactions nécessaires	Volume du SensiQuant Master Mix (µl)	Volume du SensiQuant RT (µl)	Nr d'échantillons
1	14	192,64	14	3,36
2	16	220,16	16	3,84
3	18	233,92	17	4,08
4	20	275,20	20	4,80
5	22	302,72	22	5,28
6	24	330,24	24	5,76
7	26	357,76	26	6,24
8	28	385,28	28	6,72
9	30	412,80	30	7,20
10	32	440,32	32	7,68
11	34	467,84	34	8,16
12	36	495,36	36	8,64
13	38	522,88	38	9,12
14	40	550,40	40	9,60
15	42	577,92	42	10,08
16	44	605,44	44	10,56
17	46	632,96	46	11,04
18	48	660,48	48	11,52
19	50	688,00	50	12,00

- 3) Transférer, en déposant délicatement dans le fond des puits de la microplaque, 15 µl du "mélange de pré-réaction P230" ainsi obtenu, en suivant l'ordre établi sur le **Plan de travail**.
- 4) Transférer, en déposant délicatement dans le fond des puits de la microplaque, 15 µl du "mélange de pré-réaction ABL" ainsi obtenu, en suivant l'ordre établi sur le **Plan de travail**.
- 5) Transférer, en déposant délicatement dans le fond, 5 µl d'**Eau Ultrapure** (éprouvette avec bouchon TRANSPARENT) dans les puits de la microplaque correspondant aux contrôles négatifs d'amplification pour P230 et ABL, en suivant l'ordre établi sur le **Plan de travail**.
- 6) Transférer, en déposant délicatement dans le fond, 5 µl d'**ARN** (de concentration 0.3 µg/µl, 0.1 µg/µl ou

0.05 µg/µl) du premier échantillon dans les puits correspondant "P230" et "ABL" de la microplaque. Procéder de façon identique avec tous les autres ARN, en suivant l'ordre établi sur le **Plan de travail**.

- 7) Transférer, en déposant délicatement dans le fond, 5 µl de **SensiQuant P230 STANDARD** 10 copies dans les deux puits "P230" de la microplaque, en suivant le **Plan de travail**. Procéder de façon identique pour les autres **puits dédiés à la courbe STANDARD P230** (10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> copies).

**REMARQUE:** Dans le cas d'une analyse qualitative, seul le point **SensiQuant P230 Standard** 10<sup>4</sup> copies ou le **SensiQuant P230 Positive Control** sera distribué dans les deux puits «P230», comme établi dans le plan de travail.

- 8) Transférer, en déposant délicatement dans le fond, 5 µl de **SensiQuant P230 STANDARD** 10<sup>2</sup> copies dans les deux puits "ABL" de la microplaque, en suivant le **Plan de travail**. Procéder de façon identique pour les autres **puits dédiés à la courbe STANDARD ABL** (10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> copies).

**REMARQUE:** Dans le cas d'une analyse qualitative, seul le point **SensiQuant P230 Standard** 10<sup>4</sup> copies ou le **SensiQuant P230 Positive Control** sera distribué dans les deux puits «ABL», comme établi dans le plan de travail.

- 9) Sceller soigneusement la microplaque avec le feuillet adhésif et centrifuger rapidement. Si vous utilisez l'instrument Qiagen Rotor-Gene Q, fermez soigneusement les tubes avec les bouchons appropriés.
- 10) Transférer la microplaque ou les tubes dans le thermocycleur pour PCR en temps réel et démarrer le cycle thermique d'amplification.

### Acquisition et interprétation des résultats:

#### **③ Validation générale de l'amplification et de la révélation:**

##### Dosage Quantitatif

Les valeurs de fluorescence émise par les sondes spécifiques pour BCR/ABL P230 et pour ABL dans les réactions d'amplification des quatre ADN standard de quantité connue sont utilisées pour calculer les **Courbes Standard** et pour valider l'amplification et la révélation.

On calcule une courbe de régression linéaire ( $y = ax + b$ ) pour chaque gène (ABL et BCR/ABL) pour lequel "a" correspond au **Coefficient angulaire** de la

droite et "b" représente l'ordonnée à l'origine. Le **Coefficient de Corrélation Linéaire (R2)** est calculé. Il définit les limites d'acceptabilité de la courbe standard, comme décrit dans le tableau suivant:

Coefficient de corrélation linéaire (R2)	Intervalle d'acceptabilité	Amplification / Révélation
BCR/ABL P230	$0,990 \leq R2 \leq 1,000$	VALIDE
ABL courbe standard	$0,990 \leq R2 \leq 1,000$	VALIDE

Si la valeur du Coefficient de Corrélation ne rentre pas dans les limites, des problèmes se sont vérifiés pendant la phase d'amplification ou de révélation (volumes de mélange réactionnel erroné, dégradation de la sonde, distribution erronée des standards, indication erronée de la position des standards, indication erronée du cycle thermique) qui peuvent causer des résultats erronés.

**Le dosage n'est pas valide et doit être répété.**

**Consultez le « Guide pour la résolution des problèmes » à la fin du document pour identifier une solution.**

Etant donné que les standards sont constitués de dilutions avec facteur 10, le **Coefficient Angulaire théorique de la courbe est de -3,3**. Selon Van der Velden et al., Leukemia 2003, un coefficient angulaire compris entre -3,0 et -3,9 est acceptable tant que > 0,95. Toutefois, il est souhaitable d'obtenir une valeur R2 supérieure à 0,99 pour obtenir des résultats précis (Branford et al., Leukemia 2006).

##### Dosage Qualitatif

Pour les instruments Biorad, Thermo Scientific et Qiagen, la session ne doit être considérée comme valide que si le contrôle positif pour le gène BCR / ABL et le gène de contrôle ABL montre la valeur moyenne du cycle de coupure indiquée dans le tableau ci-dessous:

Appareils	Moyenne du Ct ABL	Moyenne du Ct BCR/ABL	Amplification / Révélation
CFX96, CFX Connect	≤ 26.5	≤ 26.0	VALIDE
ABI 7900	≤ 27	≤ 26.5	VALIDE
Rotor-Gene Q	≤ 26.5	≤ 26	VALIDE

##### Contrôle négatif

Les valeurs de fluorescence émise par les sondes spécifiques pour BCR/ABL P230 et pour ABL dans les réactions d'amplification du **Contrôle négatif** et la valeur **Seuil (Threshold)** de fluorescence établie pour la session

d'amplification sont utilisées pour valider l'amplification et la révélation comme décrit dans le tableau suivant:

Cycle seuil du contrôle négatif (FAM)	Intervalle d'acceptabilité	Amplification / Révélation
Non déterminé	NEGATIF	CORRECTE

Si le résultat de la réaction d'amplification du Contrôle négatif est différent de "Non Déterminé", la présence d'ADN cible a été révélée (détermination d'un Ct cycle seuil), des problèmes ont été rencontrés pendant la phase d'amplification (contamination) qui peuvent causer des résultats erronés et des faux positifs.

**Le dosage n'est pas valide et doit être répété. Consulter le "Guide pour la résolution des problèmes" à la fin du document pour trouver une solution.**

### ➤ Recherche de BCR/ABL P230 dans les échantillons cliniques analysés:

Les **Valeurs de Fluorescence** émises par les sondes spécifiques pour BCR/ABL P230 et ABL dans les réactions d'amplification de chaque **échantillon** et la Valeur Seuil (**Valeur de Threshold**) de fluorescence sont utilisées pour révéler la présence d'ADNc cible par la détermination du **Cycle seuil**.

**REMARQUE:** Vérifier sur le programme des appareils utilisés que la valeur de Ct enregistrée corresponde à une augmentation rapide et régulière de la valeur de fluorescence et ne dérive pas de pics isolés ou à une augmentation du bruit de fond.

Avec l'affichage logarithmique (LOG), la courbe doit être sigmoïde, c'est-à-dire avec la forme caractéristique en "S".

Quand ce kit est utilisé pour la recherche de BCR/ABL P230, les résultats relatifs à chaque échantillons sont utilisés comme décrit dans le tableau suivant:

### Dosage Quantitatif

Résultat du Test		Qualité de l'échantillon	Résultat du Dosage	ARNm de BCR/ABL P230
P230 (Ct)	ABL (Copies totales)			
Ct NON Déterminé	< 10.000 copies ou non déterminé	<b>NON ADAPTEE</b>	<b>NON VALIDE</b>	/
	> 10.000 copies	<b>ADAPTEE</b>	<b>VALIDE, NEGATIF</b>	ABSENT
Ct Déterminé	< 10.000 copies ou non déterminé	<b>ADAPTEE (*)</b>	<b>VALIDE, POSITIF</b>	PRESENT
	> 10.000 copies	<b>ADAPTEE</b>	<b>VALIDE, POSITIF</b>	PRESENT

- Si le résultat de la réaction d'amplification pour un échantillon est "Ct NON déterminé" pour P230 et "Nombre de Copies Totales < 10.000 ou non déterminé" pour ABL

le test n'a **PAS** révélé une quantité suffisante d'ADNc pour ABL pour effectuer correctement l'analyse.

Ce résultat peut être dû à des problèmes pendant la phase d'amplification (amplification faible ou nulle) ou pendant la phase de transcription inverse (transcription inverse faible ou nulle) ou pendant la phase d'extraction (absence d'ARN ou présence d'inhibiteurs) qui peuvent causer des résultats faux-négatifs.

**Dans ces cas, l'échantillon n'est pas adapté. Le test n'est pas valide et doit être répété à partir de l'extraction d'un nouvel échantillon.**

- Si le résultat de la réaction d'amplification pour un échantillon est "Ct NON déterminé" pour P230 et "Nombre de Copies Totales > 10.000" pour ABL

l'ADNc pour BCR/ABL P230 n'a pas été relevé dans l'échantillon et l'échantillon est considéré comme adapté et négatif. Toutefois, la présence d'ADNc P230 à une concentration inférieure à la limite de sensibilité du produit ne peut pas être exclue. Dans ce cas le résultat serait un faux-négatif. **Les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en tenant compte de toutes les données cliniques et des autres examens de laboratoires effectués sur le patient.**

**(\*) REMARQUE:** Quand l'ADNc pour BCR/ABL P230 est révélé dans la réaction d'amplification pour un échantillon et que l'amplification de l'ADNc pour ABL donne comme résultat

"Nombre de Copies Totales < 10.000 ou non déterminé"

l'échantillon est adapté en termes de qualité et le résultat positif du test est valide.

Dans ce cas, toutefois, les données ne peuvent être utilisées pour l'analyse quantitative des résultats (voir pages suivantes).

**Dosage Qualitatif**

Résultat du Test		Qualité de l'échantillon	Résultat du Dosage	ARNm de BCR/ABL P230
BCR/ABL (Ct)	ABL (Ct)			
Ct NON Déterminé	> Ct Contrôle positif	<b>NON ADAPTEE</b>	<b>NON ADAPTEE</b>	/
	≤ Ct Contrôle positif	<b>ADAPTEE</b>	<b>ADAPTEE, NEGATIF</b>	ABSENT
Ct Déterminé	Tous les cas	<b>ADAPTEE</b>	<b>ADAPTEE, POSITIF *</b>	ABSENT

**Attention!** Le Ct du contrôle positif du gène ABL dépend de l'instrument utilisé. Voir le tableau dans la section « Validation générale de l'amplification et de la détection : test qualitatif »

- Si le résultat de la réaction d'amplification pour un échantillon est **"Ct NON déterminé" pour P230**

**et**

**Ct ABL Échantillon > Ct ABL Contrôle positif**

**le test n'a PAS révélé une quantité suffisante d'ADNc pour ABL pour effectuer correctement l'analyse.**

Ce résultat peut être dû à des problèmes pendant la phase d'amplification (amplification faible ou nulle) ou pendant la phase de transcription inverse (transcription inverse faible ou nulle) ou pendant la phase d'extraction (absence d'ARN ou présence d'inhibiteurs) qui peuvent causer des résultats faux-négatifs.

**Dans ces cas, l'échantillon n'est pas adapté. Le test n'est pas valide et doit être répété à partir de l'extraction d'un nouvel échantillon.**

- Si le résultat de la réaction d'amplification pour un échantillon est **"Ct NON déterminé" pour P230**

**et**

**Ct ABL Échantillon ≤ Ct ABL Contrôle positif**

l'ADNc pour BCR/ABL P230 n'a pas été relevé dans l'échantillon et l'échantillon est considéré comme adapté et négatif. Toutefois, la présence d'ADNc P230 à une concentration inférieure à la limite de sensibilité du produit ne peut pas être exclue. Dans ce cas le résultat serait un faux-négatif. **Les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en tenant compte de toutes les données cliniques et des autres examens de laboratoires effectués sur le patient.**

- Si le résultat de la réaction d'amplification pour un échantillon est **"Ct déterminé" pour P230** **signifie que le résultat du test est valide (quel que soit le résultat du Ct ABL Échantillon) : l'échantillon est positif.**

\* **REMARQUE.** Toutefois, si la réaction du contrôle **ABL est négative ou avec un Ct supérieur au contrôle positif**, un tel résultat incohérent pourrait être une indication d'une confusion d'échantillon, auquel cas il est recommandé de **répéter le test.**

**Dosage quantitatif de BCR/ABL P230:**

Les valeurs de fluorescence émise par les sondes spécifiques pour BCR/ABL P230 dans les réactions d'amplification de chaque échantillon et la Courbe Standard de la session d'amplification sont utilisées pour calculer la **Quantité** d'ADNc cible présent dans les réactions d'amplification relatives à chaque échantillon.

Le kit **SensiQuant P230 MasterMix** est en mesure de doser un nombre de molécules d'ADNc de BCR/ABL P230 par réaction d'amplification compris entre 1.000.000 et 10 copies, comme décrit dans le tableau suivant:

Résultat de l'échantillon (FAM P230)	ADNc de BCR/ABL P230 par réaction
Quantité > 1x10 <sup>6</sup>	SUPERIEUR A 1.000.000 DE COPIES
10 ≤ Quantité ≤ 1x10 <sup>6</sup>	= Quantité
Quantité < 10	INFERIEUR A 10 COPIES

Les valeurs de fluorescence émise par la sonde spécifique pour ABL dans les réactions d'amplification de chaque échantillon et la Courbe standard de la session d'amplification sont utilisées pour calculer la Quantité d'ADNc cible présente dans les réactions d'amplification relative à chaque échantillon.

Ce kit est en mesure de doser un nombre de molécules d'ADNc d'ABL par réaction d'amplification compris entre 1.000.000 et 10 copies. Toutefois, pour un **dosage quantitatif**, l'intervalle utile est compris entre 1.000.000 et 10.000 copies.

Quand ce kit est utilisé pour le dosage quantitatif de BCR/ABL P230, les résultats (**Quantité**) des réactions d'amplification relatives à chaque échantillon sont utilisés pour calculer le nombre de copies de BCR/ABL P230 normalisé par rapport au nombre total de copies d'ABL présentes dans l'échantillon de départ selon cette formule:

$$P230\% = \frac{\text{Somme nombre de copies BCR / ABL P230}}{\text{Somme nombre de copies d'ABL}} \times 100$$

Avant de calculer la valeur en pourcentage de P230 il est nécessaire d'analyser les données obtenues dans les doublons techniques des échantillons.

Le tableau suivant présente les différentes situations qui pourront se vérifier durant l'amplification d'une session et l'approche conseillée pour évaluer les données:

Echantillon	Qualité de l'échantillon	cDNA pour P230	Quantité d'ADNc de P230	Quantité d'ADNc d'ABL
1ère répétition	Adaptée	PRESENT	Somme des copies de P230	Somme des copies d'ABL
2ème répétition	Adaptée	PRESENT		
1ère répétition	Adaptée	ABSENT	0	Somme des copies d'ABL
2ème répétition	Adaptée	ABSENT		
1ère répétition	Adaptée	PRESENT (< 10 copies)	Somme des copies de P230	Somme des copies d'ABL
2ème répétition	Adaptée	ABSENT		
1ère répétition	Adaptée	PRESENT (> 10 copies)	Somme des copies de P230	Somme des copies d'ABL
2ème répétition	Adaptée	ABSENT		
1ère répétition	Non adaptée	PRESENT/ ABSENT	Répéter l'analyse	
2ème répétition	Adaptée	PRESENT/ ABSENT		
1ère répétition	Non adaptée	PRESENT/ ABSENT	Répéter l'analyse	
2ème répétition	Non adaptée	PRESENT/ ABSENT		

**Remarque:** Les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en considérant toutes les données cliniques et les autres examens de laboratoire effectués sur le patient.

#### LIMITATIONS A LA PROCEDURE

Avec ce produit:

- ➊ Utiliser exclusivement de l'ARN total extrait de sang périphérique ou de moelle prélevé en EDTA ou en citrate de sodium et des suspensions de lymphomonocytes et/ou de leucocytes.
- ➋ Ne pas utiliser d'ARN extrait d'échantillon héparinisé car l'héparine inhibe les réactions d'amplification et de transcription inverse et pourrait de ce fait donner lieu à des résultats non valides.
- ➌ Ne pas utiliser d'ARN contenant des résidus d'hémoglobine ou de Ficoll™ car ces substances peuvent inhiber les réactions d'amplification et de transcription inverse et pourrait de ce fait donner lieu à des résultats non valides.

Les effets de substances comme les antibiotiques, les médicaments antiviraux, les médicaments utilisés en chimiothérapie ou les médicaments

immunosuppresseurs sur l'inhibition ne sont pas disponibles.

Les résultats obtenus avec ce produit dépendent des procédures de prélèvement, de transport, de conservation et de préparation des échantillons. Afin d'éviter des résultats erronés il est nécessaire de porter une attention particulière durant ces phases pré-analytiques.

Du fait de sa grande sensibilité analytique, le protocole d'amplification des acides nucléiques, sur lequel ce produit est basé, est sujet à contamination par des échantillons cliniques positifs pour P230, des contrôles positifs et des produits d'amplification.

Les phénomènes de contamination produisent des résultats faux-positifs. Ce phénomène peut être évité en suivant les bonnes pratiques de laboratoire et en respectant scrupuleusement les instructions fournies dans ce manuel.

Ce produit nécessite:

- l'utilisation de personnel expert dans la manipulation d'échantillons biologiques potentiellement infectés et des substances chimiques et des préparations classées comme dangereuses, dans le but de prévenir des accidents ayant des conséquences potentiellement graves pour l'utilisateur et d'autres personnes.
- l'utilisation de vêtements de travail et de locaux adaptés à la manipulation d'échantillons biologiques potentiellement infectés et des substances chimiques et des préparations classées comme dangereuses, dans le but de prévenir des accidents ayant des conséquences potentiellement graves pour l'utilisateur et d'autres personnes.
- L'utilisation de personnel formé aux techniques de biologie moléculaire, telles que l'extraction, l'amplification et la révélation des acides nucléiques afin d'éviter des résultats erronés.
- La présence de zones séparées pour les phases d'extraction/ préparation des réactions d'amplification et d'amplification/ révélation des produits d'amplification, afin d'éviter des faux-positifs.
- L'utilisation d'appareils et de vêtements de travail réservés pour les phases d'extraction/ préparation des réactions d'amplification et d'amplification/ révélation des produits d'amplification, afin d'éviter des faux-positifs.

Un résultat négatif obtenu avec ce produit suggère que le transcrit pour BCR/ABL P230 n'a pas été relevé dans l'échantillon en analyse. Toutefois, le titre du transcrit pour BCR/ABL P230 peut être inférieur à la limite de sensibilité du produit.

Dans ce cas le résultat pourrait être un faux-négatif.

Comme pour chaque dispositif diagnostic:

- Les résultats obtenus avec ce produit doivent être interprétés en tenant compte de toutes les données cliniques et de laboratoire du patient.
- Il existe un risque résiduel d'obtenir des résultats non valides, des faux-positifs ou des faux-négatifs. Ce risque résiduel ne peut être éliminé ou réduit ultérieurement. Dans des situations particulières, telles que le diagnostic d'urgence, ce risque résiduel peut contribuer à la prise de décisions erronées avec des conséquences potentiellement graves pour le patient.

## GUIDE POUR LA RESOLUTION DES PROBLEMES

<b>Échantillon non valide: résultat négatif de la réaction de contrôle (ABL)</b>	
<b>Causes probables</b>	<b>Solutions</b>
Échantillon non distribué	Répétez la réaction d'amplification One-Step
Présence d'inhibiteurs	Répétez la réaction d'amplification en une étape en diluant l'extrait 1: 5 et 1:10 Répétez l'extraction à partir d'un plus petit volume d'échantillon
Échec du processus d'extraction	Répétez l'extraction
Dégradation de l'échantillon en raison d'un stockage inapproprié	Répétez la réaction avec une nouvelle aliquote d'échantillon si disponible
Mauvais réglage du cycle thermique ou acquisition de fluorescence	Vérifiez les paramètres d'acquisition du cycle thermique et de la fluorescence et répétez l'amplification (voir la section procédure)
Mauvais réglage de l'interprétation des résultats (seuil, ligne de base, canaux sélectionnés)	Vérifiez les paramètres d'analyse de l'instrument de PCR en temps réel et analysez à nouveau les résultats obtenus (voir la section procédure)
Étanchéité défectueuse de la plaque d'amplification	Répétez la réaction d'amplification One-Step Décontaminez l'instrument en suivant les instructions du fabricant Décontaminez la zone de travail

<b>Session de travail non valide pour les contrôles positifs ou les standards quantitatifs en dehors des paramètres</b>	
<b>Contrôle positif d'analyse de qualité CP non valide ou paramètres de courbe standard non valides</b>	
<b>Causes probables</b>	<b>Solutions</b>
Échantillon non distribué ou pas correctement distribué	Répétez la réaction d'amplification One-Step Dans le cas où un seul des réplicats CP est dans les limites acceptables, poursuivez l'analyse Dans le cas où l'un des standards n'est pas aligné avec la courbe d'étalonnage, excluez-le comme valeur aberrante et poursuivez l'analyse
Étanchéité défectueuse de la plaque d'amplification	Répétez la réaction d'amplification One-Step dans les cas indiqués au point précédent Décontaminez l'instrument en suivant les instructions du fabricant Décontaminez la zone de travail
Mauvais réglage du cycle thermique ou acquisition de fluorescence	Vérifiez les paramètres d'acquisition du cycle thermique et de la fluorescence et répétez l'amplification (voir la section procédure)
Mauvais stockage des réactifs ou des réactifs périmés	Répétez l'analyse en utilisant des réactifs stockés correctement et dans la durée de conservation
Mauvais schéma de distribution	Vérifier le plan de travail réalisé pour la mise en place de la session
Préparation ou distribution incorrecte du mélange de pré-réaction	Reportez-vous aux pages 8-9 de ce manuel et vérifiez les volumes de prémélange préparés et distribués sur la plaque

<b>Session de travail non valide en raison d'un contrôle NC négatif hors paramètres</b>	
<b>Causes probables</b>	<b>Solutions</b>
Contamination croisée avec un échantillon positif	Répétez la réaction d'amplification One-Step Manipulez les échantillons et les composants du kit conformément aux bonnes pratiques de laboratoire pour éviter <i>carry-over</i>
Contamination environnementale	Nettoyez les surfaces et les instruments avec les solutions de décontamination appropriées disponibles sur le marché. Dans la mesure du possible, irradier les surfaces avec des instruments U.V et / ou utiliser des outils de décontamination avec ventilation forcée / irradiation U.V.
Contamination des réactifs	Répétez la réaction d'amplification One-Step en utilisant une aliquote de réactifs précédemment inutilisée et manipulez les échantillons, les composants du kit conformément aux bonnes pratiques de laboratoire pour éviter <i>carry-over</i>

## BIBLIOGRAPHIE

N.C. Cross et al. (2015) *Leukemia* 29: 999-1003  
J. Gabert et al. (2003) *Leukemia* 17: 2318-2357  
E. Beillard et al. (2003) *Leukemia* 17: 2474-2486  
S. Branford et al., (2006) *Leukemia* 20(11):1925-30  
T. Hughes et al., (2006) *Blood* 1;108(1):28-37.  
M. Silvy et al., (2005) *Leukemia* 19(2):305-7  
D.A. Thomas et al., (2007) *Hematology ASH Educ Program. 2007* 435-43.  
V.H. van der Velden et al., (2003) *Leukemia* 17(6):1013-34.



Numéro de catalogue



Limites de températures



Code du lot



Utiliser avant



A usage de recherche uniquement



Contenu suffisant pour "N" tests



Consulter le mode d'emploi



Fabricant

**PLAN DE TRAVAIL (SCHEMA)**

Date:

Opérateur:

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

**PLAN DE TRAVAIL (SCHEMA)**

**Date:**

**Opérateur:**

1	9	17	25	33	41	49	57	65
2	10	18	26	34	42	50	58	66
3	11	19	27	35	43	51	59	67
4	12	20	28	36	44	52	60	68
5	13	21	29	37	45	53	61	69
6	14	22	30	38	46	54	62	70
7	15	23	31	39	47	55	63	71
8	16	24	32	40	48	56	64	72