

Manuale del kit *ipsogen*[®] BCR-ABL1 mbc



Versione 1

IVD

Diagnostica quantitativa in vitro

Da utilizzare con gli strumenti Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®], LightCycler[®] e SmartCycler[®]



REF

670023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANIA

R2

MAT

1072506IT



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN è il leader mondiale nelle tecnologie per campioni e analisi destinate all'isolamento e alla rilevazione del contenuto di qualsiasi campione biologico. I nostri prodotti e i nostri servizi di alta qualità sono una garanzia di successo, dall'analisi del campione al risultato.

QIAGEN definisce gli standard:

- nella purificazione del DNA, RNA e delle proteine
- nell'analisi di acidi nucleici e proteine
- nella ricerca sul microRNA e sull'RNAi
- nelle tecnologie automatizzate per campioni e analisi

Il nostro obiettivo è il vostro successo. Per ulteriori informazioni, visitare il sito www.qiagen.com.

Indice

Uso previsto	4
Sommario e spiegazioni	4
Principio della procedura	5
Materiali in dotazione	7
Contenuto del kit	7
Materiali necessari ma non in dotazione	8
Avvertenze e precauzioni	9
Precauzioni generali	10
Conservazione e manipolazione dei reagenti	10
Procedura	12
Preparazione dell'RNA dai campioni	12
<u>Protocolli</u>	
■ Trascrittasi inversa EAC standardizzata consigliata	12
■ qPCR su strumenti Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o Rotor-Gene Q 5plex HRM con rotore a 72 provette	15
■ qPCR su strumenti ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS, e LightCycler 480	19
■ qPCR su strumenti LightCycler 1.2 e 2.0	24
■ qPCR sullo strumento SmartCycler	28
Interpretazione dei risultati	31
Principio di analisi dei dati	31
Risultati	32
Guida alla risoluzione dei problemi	34
Controllo qualità	38
Limiti della metodica	38
Caratteristiche delle prestazioni	39
Studi non clinici	39
Studi clinici	41
Bibliografia	44
Simboli	45
Informazioni sui contatti	46
Informazioni per gli ordini	47

Uso previsto

Il kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr è destinato alla quantificazione dei trascritti BCR-ABL p190 in campioni di midollo osseo (BM) o sangue periferico (PB) di pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta (ALL) Ph-positiva, a cui è stato precedentemente diagnosticato un evento di fusione genica (FG) BCR-ABL mbcr. I risultati ottenuti vengono utilizzati per monitorare l'efficacia terapeutica in pazienti sottoposti a terapia e, durante il follow-up, per studiare la malattia minima residua (MRD) allo scopo di monitorare eventuali recidive patologiche.

Sommario e spiegazioni

Il cromosoma Philadelphia (Ph) è l'aberrazione del cariotipo più frequente in pazienti adulti affetti da ALL. Si manifesta nel 20–30% dei pazienti adulti affetti da ALL in generale, con un'incidenza che supera il 50% nei pazienti di età pari o superiore a 50 anni.

In questa traslocazione, la porzione 3' del proto-oncogene ABL presente sul cromosoma 9 viene giustapposta alla porzione 5' del gene BCR presente sul cromosoma 22. Il gene di fusione BCR-ABL dà origine al cromosoma Ph e codifica per una proteina tirosin-chinasi costitutivamente attiva.

Nel gene ABL i punti di rottura sono di norma nel primo introne. Nel gene BCR i punti di rottura si collocano generalmente in una delle 3 seguenti regioni: una regione di 5,8 kb tra gli esoni 12 e 16, chiamata Mbcr, ossia regione principale di raggruppamento dei punti di rottura, una sequenza di 55 kb del primo introne, chiamata mbcr, ossia regione minore di raggruppamento dei punti di rottura, e una regione μ -bcr, ossia micro-regione di raggruppamento dei punti di rottura.

I punti di rottura localizzati nella mbcr congiungono l'esone 1 (e1) al secondo esone del gene ABL (a2) producendo un trascritto di fusione di dimensioni minori, e1a2, che codifica per una proteina chimerica di 190 kDa (p190) (Figura 1). La proteina p190 BCR-ABL viene riscontrata solo nelle ALL Ph+, mentre la proteina p210 BCR-ABL è comune al 20–40% dei pazienti con ALL Ph+ e a quasi tutti i pazienti con leucemia mieloide cronica (CML) Ph+.

Tutte le forme di proteine di fusione BCR-ABL presentano un'attività tirosin-chinasica aumentata e deregolata; la forma p190 ha dimostrato di avere un potenziale trasformante superiore a quello della forma p210. Inoltre, questa proteina chimerica sembra deregolare le normali vie di trasduzione del segnale citochino-dipendenti, provocando l'inibizione dell'apoptosi o la sintesi indipendente dei fattori di crescita.

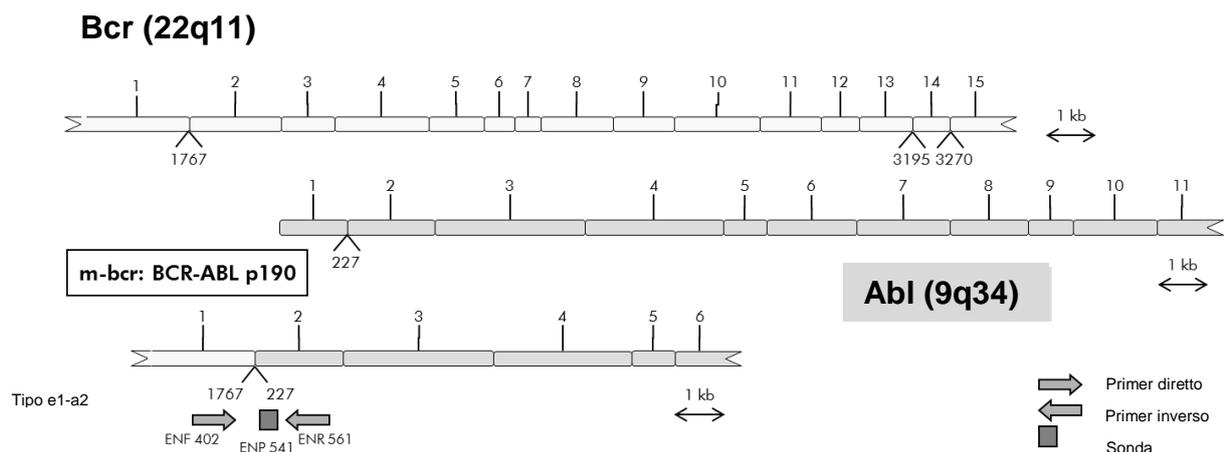


Figura 1. Rappresentazione schematica del trascritto FG BCR-ABL mbc coperto dal set di primer e sonda qPCR: ENF402–ENP541–ENR561. Il numero sotto i primer e la sonda si riferisce alla posizione del nucleotide nel trascritto genetico normale.

La terapia dei pazienti ALL Ph+ è stata ottimizzata dall'introduzione degli inibitori tirosin-chinasici, che hanno migliorato significativamente la sopravvivenza di questi pazienti (per una valutazione, vedere il riferimento bibliografico 1). Per questi pazienti è necessario il monitoraggio della MRD. L'attuale metodologia impiegata per misurare il livello di MRD prevede l'impiego della reazione quantitativa a catena della polimerasi (qPCR) in tempo reale, che consente di mettere in relazione i numeri di trascritti BCR-ABL ai numeri di trascritti di un gene di controllo. Il kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbc si basa su questa tecnica.

Principio della procedura

La qPCR consente l'accurata quantificazione dei prodotti della PCR durante la fase esponenziale del processo di amplificazione della PCR. I dati della PCR quantitativa possono essere ottenuti rapidamente, senza ricorrere a trattamento post-PCR, rilevando in tempo reale i segnali di fluorescenza durante e/o dopo i cicli della PCR, riducendo così drasticamente il rischio di contaminazione del prodotto della PCR. Le tecniche della qPCR attualmente disponibili appartengono a 3 tipi principali: analisi qPCR tramite fluorocromo SYBR® Green I, analisi qPCR tramite sonde idrolitiche e analisi qPCR tramite sonde di ibridazione.

Il presente test si basa sul principio dell'idrolisi dell'oligonucleotide a doppio fluorocromo qPCR. Durante la PCR, i primer diretti e inversi ibridizzano secondo una sequenza specifica. La stessa miscela contiene un oligonucleotide a doppio fluorocromo. Questa sonda, costituita da un oligonucleotide le cui estremità sono marcate da due fluorocromi, un reporter all'estremità 5' e un quencher all'estremità 3', ibridizza sulla sequenza bersaglio nel prodotto della PCR. L'analisi in qPCR con sonde idrolitiche sfrutta l'attività di esonucleasi 5'→3' della DNA polimerasi del batterio *Thermus aquaticus* (*Taq*). Quando la sonda è intatta, il reporter e il quencher sono posizionati a una distanza tale da

permettere al quencher di sopprimere la fluorescenza del reporter, fondamentalmente ad opera di un trasferimento di energia di tipo Förster.

Durante la PCR, se il bersaglio di interesse è presente, la sonda ibridizza specificamente i siti dei primer inversi e diretti. L'attività esonucleasica 5'→3' della DNA polimerasi scinde la sonda tra il reporter e il quencher solo se la sonda ibridizza sul bersaglio. I frammenti della sonda vengono poi allontanati dal bersaglio, mentre la polimerizzazione del filamento continua. L'estremità 3' della sonda è bloccata al fine di prevenirne l'estensione durante la PCR (Figura 2). Questo processo si verifica a ogni ciclo e non interferisce con l'accumulo esponenziale di prodotto.

L'aumento del segnale di fluorescenza è rilevato solo se la sequenza target è complementare alla sonda e quindi amplificata durante la PCR. A causa di questi requisiti, l'amplificazione aspecifica non viene rilevata. Pertanto l'aumento della fluorescenza è direttamente proporzionale all'amplificazione bersaglio durante la PCR.

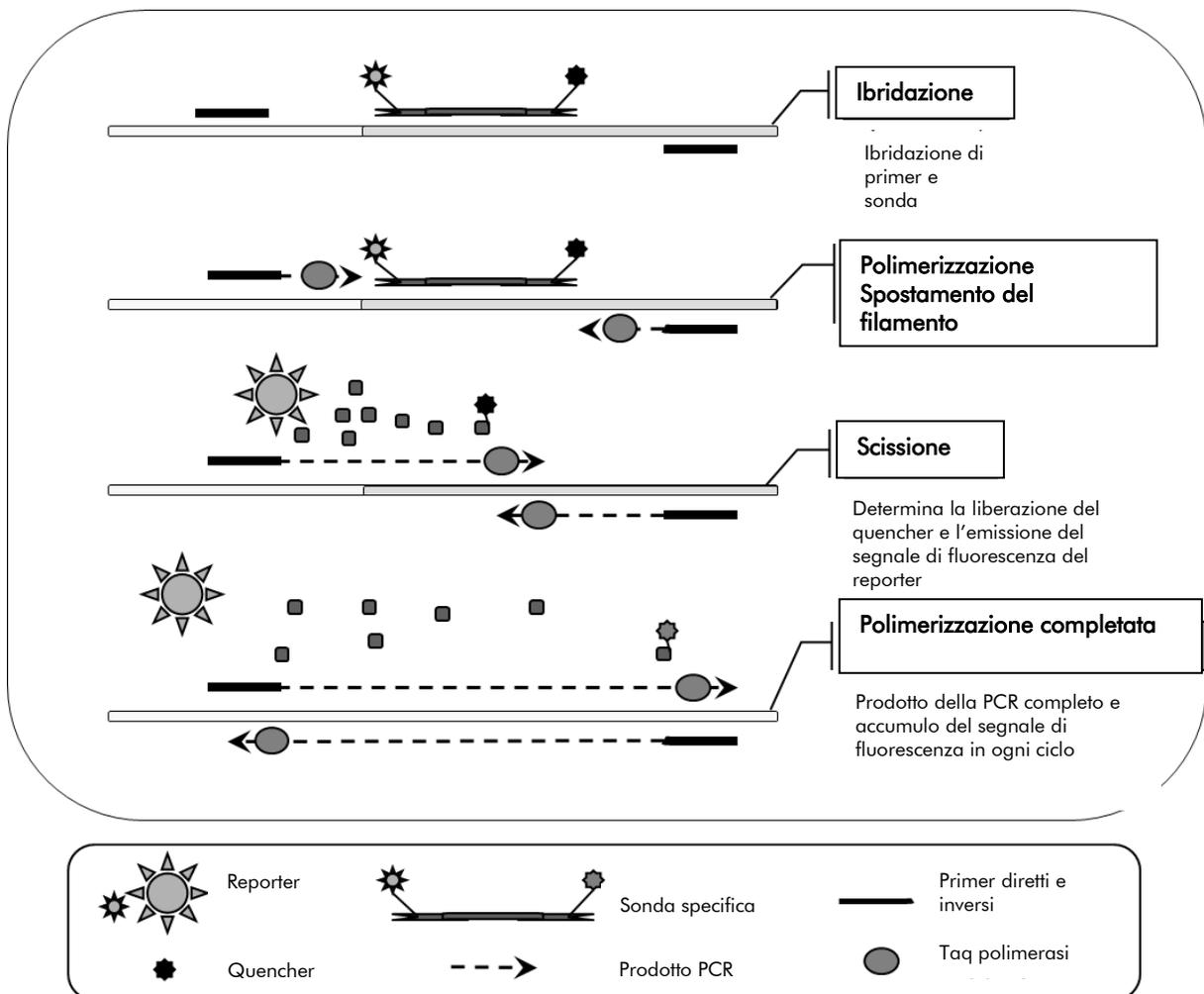


Figure 2. Principio della reazione. L'RNA totale viene retrotrascritto e il cDNA generato viene amplificato mediante PCR per mezzo di una coppia di primer specifici e di una sonda interna specifica a doppio fluorocromo (FAM™–TAMRA™). La sonda si lega all'amplicone durante ogni fase di ibridazione della PCR. Estendendosi dal legame del primer all'amplicone, la Taq DNA polimerasi allontana l'estremità 5' della sonda, che viene poi degradata

dall'attività esonucleasica 5'→3' della Taq DNA polimerasi. La scissione continua finché la sonda residua non si lega all'amplicone. Questo processo libera in soluzione il fluoroforo e il quencher, separandoli e determinando un aumento di fluorescenza dal FAM e una diminuzione di fluorescenza dal TAMRA.

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

ipsogen BCR-ABL1 mbc Kit		(24)
Catalogo n°		670023
Numero di reazioni		24
ABL Control Gene Standard Dilution (diluizione standard del gene di controllo ABL) (10 ³ copie/5 µl)	C1-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (diluizione standard del gene di controllo ABL) (10 ⁴ copie/5 µl)	C2-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (diluizione standard del gene di controllo ABL) (10 ⁵ copie/5 µl)	C3-ABL	50 µl
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (diluizione standard del gene di fusione BCR-ABL mbc) (10 ¹ copie/5 µl)	F1-BCR-ABL e1a2 mbc	50 µl
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (diluizione standard del gene di fusione BCR-ABL mbc) (10 ² copie/5 µl)	F2-BCR-ABL e1a2 mbc	50 µl
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (diluizione standard del gene di fusione BCR-ABL mbc) (10 ³ copie/5 µl)	F3-BCR-ABL e1a2 mbc	50 µl
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (diluizione standard del gene di fusione BCR-ABL mbc) (10 ⁵ copie/5 µl)	F4-BCR-ABL e1a2 mbc	50 µl
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (diluizione standard del gene di fusione BCR-ABL mbc) (10 ⁶ copie/5 µl)	F5-BCR-ABL e1a2 mbc	50 µl

ipsogen BCR-ABL1 mbcr Kit		(24)
Catalogo n°		670023
Numero di reazioni		24
Primers and Probe Mix ABL* (miscela di primer e sonda ABL)	PPC-ABL 25x	90 µl
Primers and Probe Mix BCR-ABL mbcr Fusion Gene (miscela di primer e sonda gene di fusione BCR-ABL mbcr) †	PPF-mbcr 25x	110 µl
ipsogen <i>BCR-ABL1 mbcr Kit Handbook</i> (inglese)		1

* Miscela di primer inversi e diretti specifici per il gene di controllo ABL più una sonda FAM-TAMRA specifica.

† Miscela di primer inversi e diretti specifici per il gene di fusione BCR-ABL mbcr più una sonda FAM-TAMRA specifica.

Nota: Prima dell'uso centrifugare brevemente le diluizioni standard e le miscele di primer e sonda.

Materiali necessari ma non in dotazione

Durante l'uso di sostanze chimiche, indossare sempre un adeguato camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

Reagenti

- Acqua per PCR priva di nucleasi
- Reagenti per trascrittasi inversa: il reagente convalidato è la Superscript® II (o Superscript) Reverse Transcriptase, che include tampone "first-strand" 5x, 100 mM di DTT (Life Technologies, cat. n° 18064-022)
- Inibitore della RNasi: il reagente convalidato è RNaseOUT™ (Life Technologies, cat. n° 10777-019)
- Set di dNTP, per PCR
- Esometro qualsiasi
- MgCl₂
- Tampone e Taq DNA polimerasi: i reagenti convalidati sono TaqMan® Universal PCR Master Mix (miscela master per PCR 2x) (Life Technologies,

cat. n° 4304437) e LightCycler TaqMan Master (miscela master per PCR 5x) (Roche, cat. n° 04535286001)

Materiali di consumo

- Puntali per pipetta per PCR sterili, resistenti alla contaminazione da aerosol, privi di nucleasi, con filtri idrofobici
- Provette per PCR prive di RNasi e DNasi da 0,5 ml o 0,2 ml
- Ghiaccio

Attrezzatura

- Pipetta con graduazione in microlitri* dedicata per PCR (1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1000 μ l)
- Centrifuga da banco* con rotore per provette di reazione da 0,2 ml/0,5 ml (in grado di raggiungere 10.000 giri/min)
- Strumento per PCR in tempo reale:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o altro strumento Rotor-Gene; LightCycler 1.2, 2.0, o 480; ABI PRISM 7000, 7700, o 7900HT SDS; o strumento SmartCycler; e materiale specifico associato
- Termociclatore* o bagnomaria* (fase di trascrittasi inversa)

Reagenti complementari

- Kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Controls (cat. n° 670091), costituito da linee cellulari con espressione negativa, elevata e debolmente positiva del gene di fusione BCR-ABL mbc per la convalida qualitativa dell'estrazione dell'RNA e la trascrittasi inversa

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

Durante l'uso di sostanze chimiche, indossare sempre un adeguato camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per ulteriori informazioni, consultare le appropriate schede di sicurezza (SDS). Le schede SDS, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

Smaltire i campioni e i residui dei test secondo le disposizioni locali in materia di sicurezza.

* Assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.

Precauzioni generali

Per effettuare i test qPCR è necessario attenersi a buone pratiche di laboratorio, come la manutenzione dell'attrezzatura, appositamente dedicate alla biologia molecolare e conformi alle leggi vigenti e ai relativi standard.

Questo kit è destinato all'uso diagnostico in vitro. Le istruzioni e i reagenti forniti nel kit sono stati approvati per consentire prestazioni ottimali. L'ulteriore diluizione dei reagenti o l'alterazione dei tempi di incubazione e delle temperature potrebbe generare dati errati o discordanti. I reagenti PPC e PPF potrebbero modificarsi se esposti alla luce. Tutti i reagenti sono stati formulati per essere utilizzati specificamente con il presente test. Per garantire una prestazione ottimale del test si consiglia di non effettuare sostituzioni.

La determinazione dei livelli di trascritti mediante qPCR richiede sia la trascrittasi inversa dell'mRNA che l'amplificazione del cDNA generato mediante PCR. Per questo motivo, l'intera procedura di analisi deve essere eseguita in assenza di RNasi/DNasi.

Utilizzare estrema cautela per evitare:

- contaminazione da RNasi/DNasi, che potrebbe portare a degradazione dell'mRNA stampo e del cDNA generato
- contaminazione crociata dell'mRNA o della PCR con conseguente segnale falso positivo

Si consiglia quindi quanto segue:

- Utilizzare materiale da laboratorio privo di nucleasi (ad es. pipette, puntali per pipetta, provette di reazione) e indossare i guanti durante l'esecuzione del test.
- Utilizzare puntali per pipetta nuovi e resistenti alla contaminazione da aerosol durante tutte le fasi di pipettatura per evitare fenomeni di contaminazione crociata dei campioni e dei reagenti.
- Preparare la miscela master pre-PCR con l'apposito materiale (pipette, puntali, ecc.) in un'area dedicata, in cui non siano presenti matrici di DNA (cDNA, DNA, plasmidi). Aggiungere il filamento stampo in una zona separata (preferibilmente in una stanza dedicata) utilizzando materiale specifico (pipette, puntali, ecc.).
- Manipolare le diluizioni standard (C1–3 e F1–5) in un ambiente separato.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

I kit sono spediti in ghiaccio secco e devono essere conservati a una temperatura compresa tra -30°C e -15°C al momento della ricezione.

- Minimizzare l'esposizione alla luce delle miscele di primer e sonda (provette PPC e PPF).
- Miscelare delicatamente e centrifugare le provette prima dell'apertura.
- Conservare tutti i componenti del kit nelle confezioni originali.

Le condizioni di conservazione indicate valgono sia per i componenti aperti sia per quelli non aperti. I componenti conservati in condizioni diverse da quelle indicate sulle etichette potrebbero non funzionare adeguatamente e inficiare i risultati del test.

Le date di scadenza dei reagenti sono indicate sulla rispettiva etichetta dei componenti. Se conservato correttamente, il prodotto mantiene inalterate le proprie prestazioni fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta.

Il prodotto non fornisce segnali evidenti di instabilità. Si consiglia, tuttavia, di eseguire contemporaneamente controlli positivi e negativi con campioni non noti.

Procedura

Preparazione dell'RNA dai campioni

Preparare l'RNA dai campioni dei pazienti (sangue o midollo osseo) con una procedura convalidata. La qualità del test dipende ampiamente dalla qualità dell'RNA immesso. Si consiglia, pertanto, di qualificare l'RNA purificato mediante elettroforesi su gel di agarosio* oppure utilizzando Agilent® Bioanalyzer® prima di eseguire l'analisi.

Protocollo: Trascrittasi inversa EAC standardizzata consigliata

Cosa fare prima di iniziare

- Preparare i dNTP, 10 mM ciascuno. Conservare in aliquote a -20°C.

Procedura

1. **Scongelare tutti i componenti necessari e collocarli su ghiaccio.**
2. **Incubare 1 µg di RNA (1–4 µl) per 10 minuti a 70°C e raffreddare immediatamente su ghiaccio per 5 minuti.**
3. **Centrifugare brevemente (circa 10 secondi a 10.000 giri/min, per raccogliere il liquido sul fondo della provetta), poi conservare su ghiaccio.**
4. **Preparare la seguente miscela RT a seconda del numero di campioni da analizzare (Tabella 1).**

* Durante l'uso di sostanze chimiche, indossare sempre un adeguato camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione.

Tabella 1. Preparazione della miscela RT

Componente	Volume per campione (μl)	Concentrazione finale
Tampone "first-strand" (fornito con Superscript II Reverse Transcriptase), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP (10 mM ciascuno, da preparare precedentemente e conservare in aliquote a -20°C)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, fornito con Superscript II Reverse Transcriptase)	2,0	10 mM
Inibitore della RNasi (40 U/ μ l)	0,5	1 U/ μ l
Esametro qualsiasi (100 μ M)	5,0	25 μ M
Superscript II or Superscript Reverse Transcriptase (trascrittasi inversa Superscript II o Superscript) (200 U/ μ l)	0,5	5 U/ μ l
Campione di RNA riscaldato (da aggiungere nella fase 5)	1,0-4,0	50 ng/ μ l
Acqua per PCR priva di nucleasi (da aggiungere nella fase 5)	0,0-3,0	-
Volume finale	20,0	-

- 5. Pipettare 16 μ L della miscela RT in ogni provetta per PCR. Aggiungere poi 1-4 μ l (1 μ g) di RNA (dalla fase 3) e regolare il volume a 20 μ l con acqua per PCR priva di nucleasi (vedere Tabella 2).**

Tabella 2. Preparazione della reazione di trascrittasi inversa

Componente	Volume (μl)
Miscela RT	16
Campione di RNA riscaldato (1 μ g)	1–4
Acqua per PCR priva di nucleasi	0–3
Volume finale	20

- 6. Miscelare accuratamente e centrifugare brevemente (circa 10 secondi a 10.000 giri/min, per raccogliere il liquido sul fondo della provetta),**
- 7. poi incubare a 20°C per 10 minuti.**
- 8. Incubare a 42°C su un termociclatore per 45 minuti e subito dopo a 99°C per 3 minuti.**
- 9. Raffreddare su ghiaccio (per arrestare la reazione) per 5 minuti.**
- 10. Centrifugare brevemente (circa 10 secondi a 10.000 giri/min, per raccogliere il liquido sul fondo della provetta), poi conservare su ghiaccio.**
- 11. Diluire il cDNA finale con 30 μ l di acqua per PCR priva di nucleasi in modo da ottenere un volume finale di 50 μ l.**
- 12. Eseguire la PCR secondo i protocolli di seguito descritti, in base al proprio strumento per qPCR.**

Protocollo: qPCR su strumenti Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o Rotor-Gene Q 5plex HRM con rotore a 72 provette

Se si utilizza uno di questi strumenti, si suggerisce di effettuare tutte le misurazioni in duplicato, come indicato nella Tabella 3.

Tabella 3. Numero di reazioni per strumenti Rotor-Gene Q con rotore a 72-provette

Campioni	Reazioni
Con la miscela di primer ABL e sonda (PPC-ABL)	
n campioni di cDNA	n x 2 reazioni
Standard ABL	2 x 3 reazioni (3 diluizioni, ciascuna testata in duplicato)
Acqua come materiale di controllo	2 reazioni
Con la miscela di primer BCR-ABL mbcr e sonda (PPF-mbcr)	
n campioni di cDNA	n x 2 reazioni
Standard mbcr	2 x 5 reazioni (5 diluizioni, ciascuna testata in duplicato)
Acqua come materiale di controllo	2 reazioni

Processazione dei campioni su strumenti Rotor-Gene Q con rotore a 72 provette

Si consiglia di effettuare il test con almeno 8 campioni di cDNA nel medesimo esperimento per ottimizzare l'utilizzo degli standard e delle miscele di primer e sonda.

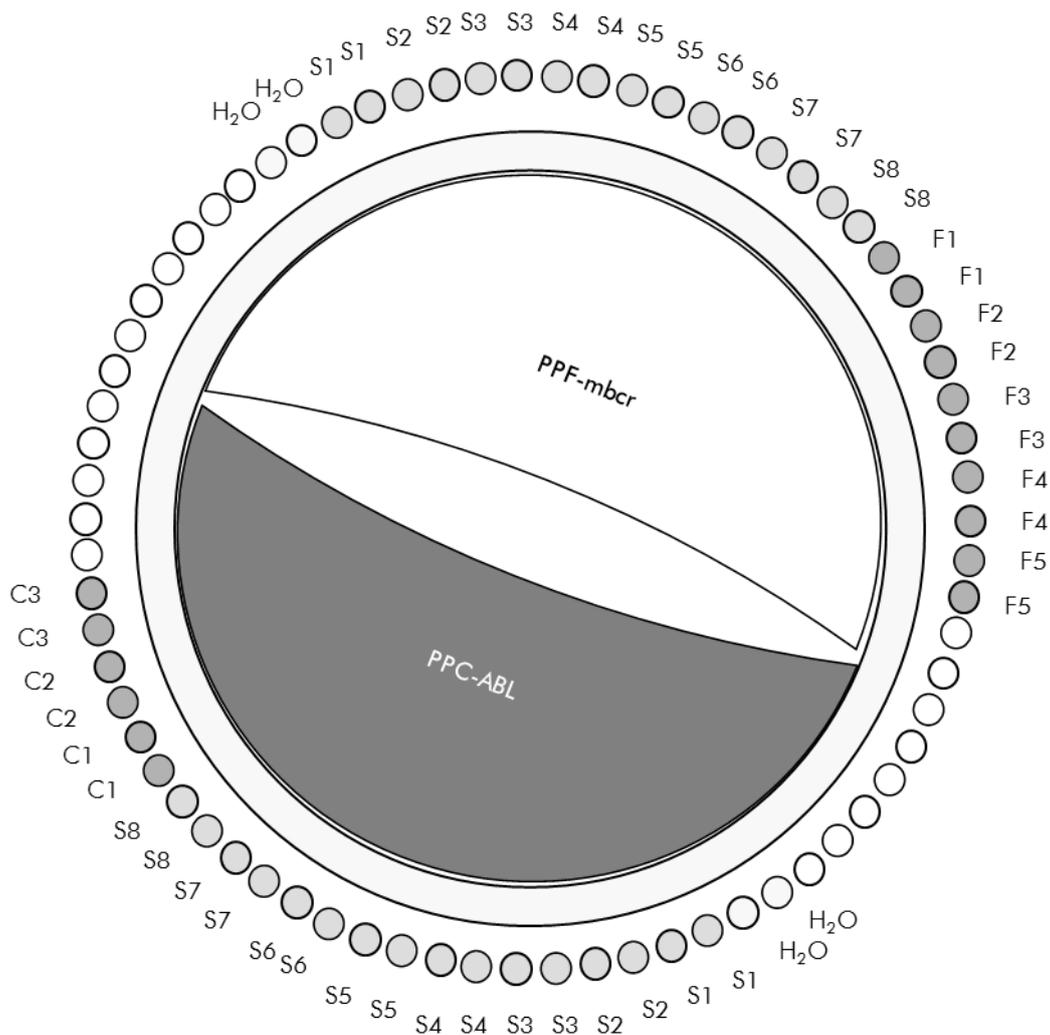


Figura 3. Configurazione consigliata del rotore per ogni esperimento con il kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr. F1–5: standard BCR-ABL mbcr; C1–3: standard ABL; S: campione di cDNA; H₂O: acqua come materiale di controllo.

Nota: Assicurarsi di posizionare sempre il campione da analizzare nella posizione 1 del rotore. In caso contrario, la fase di calibrazione dello strumento potrebbe non essere ottimale, con la conseguente acquisizione di dati di fluorescenza errati.

Inserire le provette vuote nelle posizioni rimanenti.

qPCR su strumenti Rotor-Gene Q con rotore a 72 provette

Nota: Eseguire tutte le fasi su ghiaccio.

Procedura

1. Scongelare tutti i componenti necessari e collocarli su ghiaccio.
2. Preparare la seguente miscela qPCR a seconda del numero di campioni da analizzare.

Tutte le concentrazioni sono calcolate sul volume finale di reazione.

La tabella 4 mostra lo schema di pipettatura per la preparazione di una miscela di reagenti, calcolata per ottenere un volume di reazione finale di 25 μ l. È possibile preparare una premiscela, a seconda del numero di reazioni, utilizzando la medesima miscela di primer e sonda (PPC-ABL o PPF-mbcr). Sono inclusi volumi extra per compensare eventuali errori di pipettatura.

Tabella 4. Preparazione della miscela qPCR

Componente	1 reazione (μl)	ABL: 24+1 reazioni (μl)	BCR-ABL mbcr: 28+1 reazioni (μl)	Concentrazione finale
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Miscela di primer e sonda, 25x	1	25	29	1x
Acqua per PCR priva di nucleasi	6,5	162,5	188,5	–
Campione (da aggiungere alla fase 4)	5	5 ciascuno	5 ciascuno	–
Volume totale	25	25 ciascuno	25 ciascuno	–

- 3. Dispensare 20 μ l della premiscela qPCR in ogni provetta.**
- 4. Aggiungere 5 μ l del prodotto RT (cDNA, equivalente a 100 ng di RNA) ottenuto nella trascrittasi inversa (vedere "Protocollo: Trascrittasi inversa EAC standardizzata consigliata", pag. 12) nella provetta corrispondente (volume totale 25 μ l).**
- 5. Miscelare delicatamente aspirando e rilasciando con una pipetta.**
- 6. Posizionare le provette nel termociclatore secondo le istruzioni del produttore.**

7. Programmare lo strumento Rotor-Gene Q con il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 5.

Tabella 5. Profilo termico

Modalità di analisi	Quantificazione
Mantenimento	Temperatura: 50°C Durata: 2 minuti
Mantenimento 2	Temperatura: 95°C Durata: 10 minuti
Ciclizzazione	50 volte 95°C per 15 secondi 60°C per 1 minuto con acquisizione della fluorescenza FAM nel canale Green: singolo

8. Selezionare "Slope Correct" (correggi pendenza) per la fase di analisi su strumenti Rotor-Gene Q. Si consiglia di impostare la soglia a 0,03. Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 5.

Protocollo: qPCR su strumenti ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS, e LightCycler 480

In caso di utilizzo di un dispositivo qPCR a 96 pozzetti, si suggerisce di effettuare tutte le misurazioni in duplicato, come indicato nella Tabella 6.

Tabella 6. Numero di reazioni utilizzando un dispositivo qPCR a 96 pozzetti

Campioni	Reazioni
Con la miscela di primer ABL e sonda (PPC-ABL)	
n campioni di cDNA	n x 2 reazioni
Standard ABL	2 x 3 reazioni (3 diluizioni, ciascuna testata in duplicato)
Acqua come materiale di controllo	2 reazioni
Con la miscela di primer BCR-ABL mbcr e sonda (PPF-mbcr)	
n campioni di cDNA	n x 2 reazioni
Standard mbcr	2 x 5 reazioni (5 diluizioni, ciascuna testata in duplicato)
Acqua come materiale di controllo	2 reazioni

Processazione dei campioni su strumenti ABI PRISM 7000, 7700 e 7900 SDS, e LightCycler 480

Si consiglia di effettuare il test con almeno 8 campioni di cDNA nel medesimo esperimento per ottimizzare l'utilizzo degli standard e delle miscele di primer e sonda. La configurazione della piastra nella Figura 4 mostra un esempio dell'esperimento.

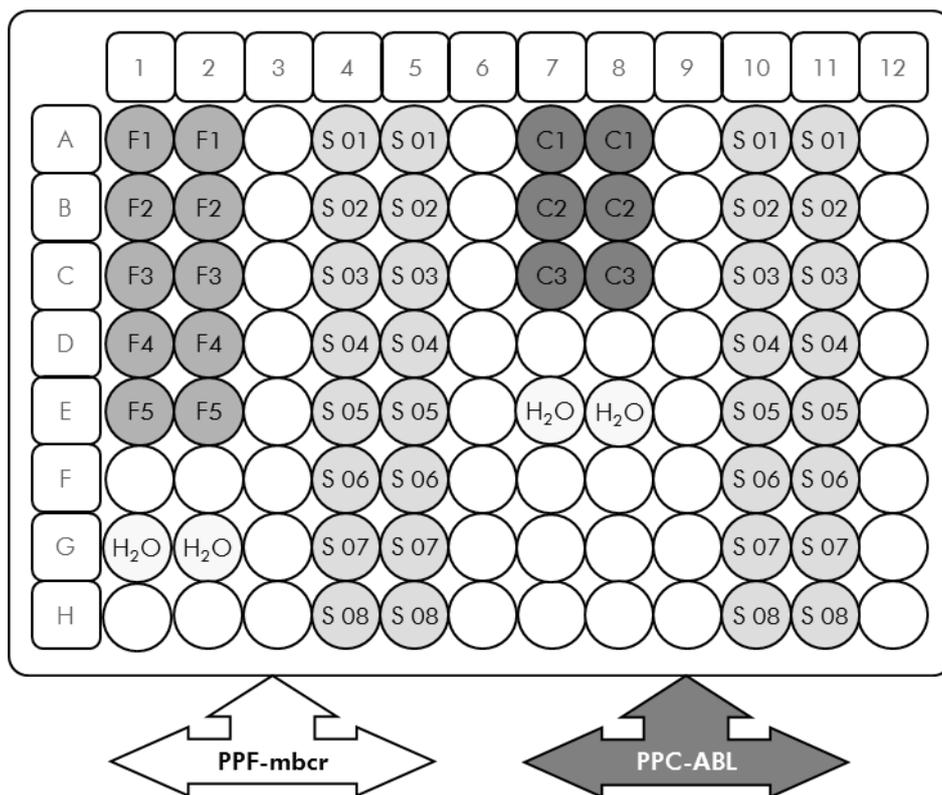


Figura 4. Configurazione della piastra consigliata per un esperimento. S: campione di cDNA; F1–5: standard BCR-ABL mbcr; C1–3: standard ABL; H₂O: acqua come materiale di controllo.

qPCR su strumenti ABI PRISM 7000, 7700 e 7900 SDS, e LightCycler 480

Nota: Eseguire tutte le fasi su ghiaccio.

Procedura

1. **Scongelare tutti i componenti necessari e collocarli su ghiaccio.**
2. **Preparare la seguente miscela qPCR a seconda del numero di campioni da analizzare. Se si utilizza un dispositivo qPCR a 96 pozzetti, si suggerisce di effettuare tutte le misurazioni in duplicato:**

Tutte le concentrazioni sono calcolate sul volume finale di reazione.

La tabella 7 mostra lo schema di pipettatura per la preparazione di una miscela di reagenti, calcolata per ottenere un volume di reazione finale di 25 μ l. È possibile preparare una premiscela, a seconda del numero di reazioni, utilizzando la medesima miscela di primer e sonda (PPC-ABL o PPF-mbcr). Sono inclusi volumi extra per compensare eventuali errori di pipettatura.

Tabella 7. Preparazione della miscela qPCR

Componente	1 reazione (μl)	ABL: 24+1 reazioni (μl)	BCR-ABL mbr: 28+1 reazioni (μl)	Concentrazione finale
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Miscela di primer e sonda, 25x	1	25	29	1x
Acqua per PCR priva di nucleasi	6,5	162,5	188,5	–
Campione (da aggiungere alla fase 4)	5	5 ciascuno	5 ciascuno	–
Volume totale	25	25 ciascuno	25 ciascuno	–

- 3. Dispensare 20 μ l della premiscela qPCR in ogni pozzetto.**
- 4. Aggiungere 5 μ l del prodotto RT (cDNA, equivalente a 100 ng di RNA) ottenuto nella trascrittasi inversa (vedere "Protocollo: Trascrittasi inversa EAC standardizzata consigliata", pag. 12) nel pozzetto corrispondente (volume totale 25 μ l).**
- 5. Miscelare delicatamente aspirando e rilasciando con una pipetta.**
- 6. Chiudere il tappo e centrifugare brevemente (300 x g, circa 10 secondi).**
- 7. Posizionare la piastra nel termociclatore secondo le istruzioni del produttore. Programmare il termociclatore con il programma di ciclizzazione termica indicato nella Tabella 8 per gli strumenti ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS, o nella Tabella 9 per lo strumento LightCycler 480.**

Tabella 8. Profilo termico per gli strumenti ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS

Modalità di analisi	Curva standard — Quantificazione assoluta
Mantenimento	Temperatura: 50°C Durata: 2 minuti
Mantenimento 2	Temperatura: 95°C Durata: 10 minuti
Ciclizzazione	50 volte 95°C per 15 secondi 60°C per 1 minuto con acquisizione della fluorescenza FAM; quencher: TAMRA

Tabella 9. Profilo termico per lo strumento LightCycler 480

Modalità di analisi	Quantificazione assoluta ("Abs Quant")
Formati di rilevazione	Selezionare "Simple Probe" (sonda semplice) nella finestra dei formati di rilevazione
Mantenimento	Temperatura: 50°C Durata: 2 minuti
Mantenimento 2	Temperatura: 95°C Durata: 10 minuti
Ciclizzazione	50 volte 95°C per 15 secondi 60°C per 1 minuto con acquisizione della fluorescenza FAM corrispondente a (483–533 nm) per la versione LC 01 e (465–510 nm) per la versione LC 02

8. Per gli strumenti ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS, seguire la fase 8a. Per lo strumento LightCycler 480, seguire la fase 8b.

8a. Strumenti ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS: si consiglia di impostare la soglia a 0,1 come descritto nel protocollo EAC nella fase di analisi sullo strumento ABI PRISM SDS e il basale fra i cicli 3 e

15. Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 8.

8b. Strumento LightCycler 480: si consiglia una modalità di analisi Fit point con rumore di fondo a 2,0 e soglia a 2,0. Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 9.

Protocollo: qPCR su strumenti LightCycler 1.2 e 2.0

Se si utilizzano strumenti per capillari, si consiglia di analizzare i campioni in duplicato e i controlli una sola volta, come indicato nella Tabella 10.

Tabella 10. Numero di reazioni per gli strumenti LightCycler 1.2 e 2.0

Campioni	Reazioni
Con la miscela di primer ABL e sonda (PPC-ABL)	
n campioni di cDNA	n x 2 reazioni
Standard ABL	1 x 3 reazioni (3 diluizioni standard, ciascuna testata una sola volta)
Acqua come materiale di controllo	1 reazione
Con la miscela di primer BCR-ABL mbcr e sonda (PPF-mbcr)	
n campioni di cDNA	n x 2 reazioni
Standard mbcr	1 x 5 reazioni (5 diluizioni standard, ciascuna testata una sola volta)
Acqua come materiale di controllo	1 reazione

Processazione dei campioni su strumenti LightCycler 1.2 e 2.0

Si consiglia di effettuare il test con almeno 5 campioni di cDNA nel medesimo esperimento per ottimizzare l'utilizzo degli standard e delle miscele di primer e sonda. La configurazione dei capillari in Figura 5 mostra un esempio dell'esperimento.

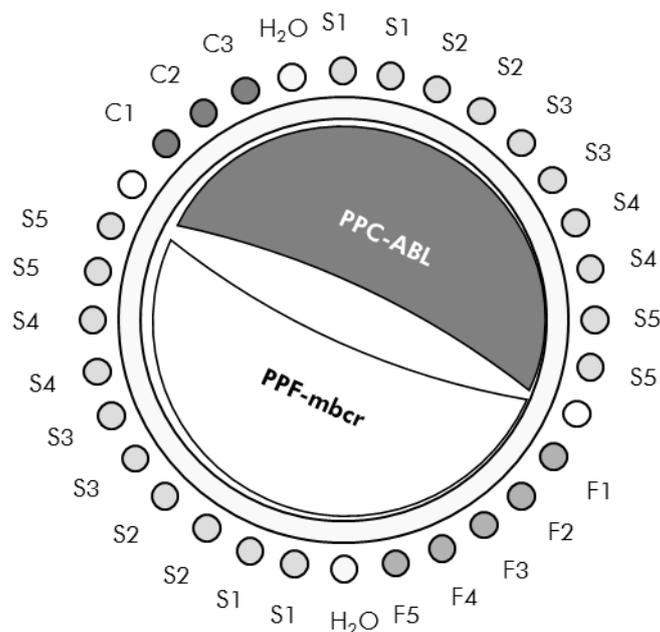


Figura 5. Configurazione consigliata del rotore per ogni esperimento con il kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr. F1–5: standard BCR-ABL mbcr; C1–3: standard ABL; S: campione di DNA sconosciuto da analizzare; H₂O: acqua come materiale di controllo.

qPCR su strumenti LightCycler 1.2 e 2.0

Nota: Visti i requisiti tecnologici particolari, gli esperimenti condotti con LightCycler devono essere effettuati utilizzando reagenti specifici. Si consiglia di utilizzare LightCycler TaqMan Master e di attenersi alle istruzioni del produttore per la preparazione della miscela master 5x.

Nota: Eseguire tutte le fasi su ghiaccio.

Procedura

- 1. Scongelare tutti i componenti necessari e collocarli su ghiaccio.**
- 2. Preparare la seguente miscela qPCR a seconda del numero di campioni da analizzare.**

Tutte le concentrazioni sono calcolate sul volume finale di reazione.

La tabella 11 mostra lo schema di pipettatura per la preparazione di una miscela di reagenti, calcolata per ottenere un volume di reazione finale di 20 μ l. È possibile preparare una premiscela, a seconda del numero di reazioni, utilizzando la medesima miscela di primer e sonda (PPC-ABL o PPF-mbcr). Sono inclusi volumi extra per compensare eventuali errori di pipettatura.

Tabella 11. Preparazione della miscela qPCR

Componente	1 reazione (μl)	ABL: 14+1 reazioni (μl)	BCR-ABL mbc: 16+1 reazioni (μl)	Concentrazione finale
LightCycler TaqMan Master Mix appena preparata, 5x	4,0	60	68,0	1x
Miscela di primer e sonda, 25x	0,8	12	13,6	1x
Acqua per PCR priva di nucleasi	10,2	153	173,4	–
Campione (da aggiungere alla fase 4)	5,0	5 ciascuno	5,0 ciascuno	–
Volume totale	20,0	20 ciascuno	20,0 ciascuno	–

- 3. Dispensare 15 μ l della premiscela qPCR in ogni capillare.**
- 4. Aggiungere 5 μ l del prodotto RT (cDNA, equivalente a 100 ng di RNA) ottenuto nella trascrittasi inversa (vedere "Protocollo: Trascrittasi inversa EAC standardizzata consigliata", pag. 12) nella provetta corrispondente (volume totale 20 μ l).**
- 5. Miscelare delicatamente aspirando e rilasciando con una pipetta.**
- 6. Posizionare i capillari negli adattatori forniti assieme all'apparecchiatura e centrifugare brevemente (700 x g, circa 10 secondi).**
- 7. Caricare i capillari nel termociclatore secondo le istruzioni del produttore.**
- 8. Programmare lo strumento LightCycler 1.2 o 2.0 con il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 12.**

Tabella 12. Profilo termico

Modalità di analisi	Quantificazione
Mantenimento	Temperatura: 95°C Durata: 10 minuti Rampa: 20
Ciclizzazione	50 volte 95°C per 10 secondi; rampa: 20 60°C per 1 minuto; rampa: 20; con acquisizione della fluorescenza FAM: singolo
Mantenimento 2	45°C per 1 minuto; rampa: 20

- 9. Per lo strumento LightCycler 1.2, seguire la fase 9a. Per lo strumento LightCycler 2.0, seguire la fase 9b.**
- 9a. LightCycler 1.2: Si consiglia di utilizzare la modalità F1/F2 e "2nd derivative analysis" (analisi della derivata seconda). Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 12.**
- 9b. LightCycler 2.0: Si consiglia di utilizzare l'analisi automatica (F''max) sul LightCycler 2.0 con versione software 4.0 per ottenere risultati riproducibili. Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 12.**

Protocollo: qPCR sullo strumento SmartCycler

Se si utilizza questo strumento, si consiglia di analizzare i campioni in duplicato e i controlli una sola volta, come indicato nella Tabella 13.

Tabella 13. Numero di reazioni per lo strumento SmartCycler

Campioni	Reazioni
Con la miscela di primer ABL e sonda (PPC-ABL)	
n campioni di cDNA	n x 2 reazioni
Standard ABL	1 x 3 reazioni (3 diluizioni standard, ciascuna testata una sola volta)
Acqua come materiale di controllo	1 reazione
Con la miscela di primer BCR-ABL mbc r e sonda (PPF-mbc r)	
n campioni di cDNA	n x 2 reazioni
Standard mbc r	1 x 5 reazioni (5 diluizioni standard, ciascuna testata una sola volta)
Acqua come materiale di controllo	1 reazione

Processazione dei campioni sullo strumento SmartCycler

Si consiglia di effettuare il test con almeno 5 campioni di cDNA nel medesimo esperimento per ottimizzare l'utilizzo degli standard e delle miscele di primer e sonda. Lo schema a due blocchi nella Figura 6 mostra un esempio dell'esperimento.

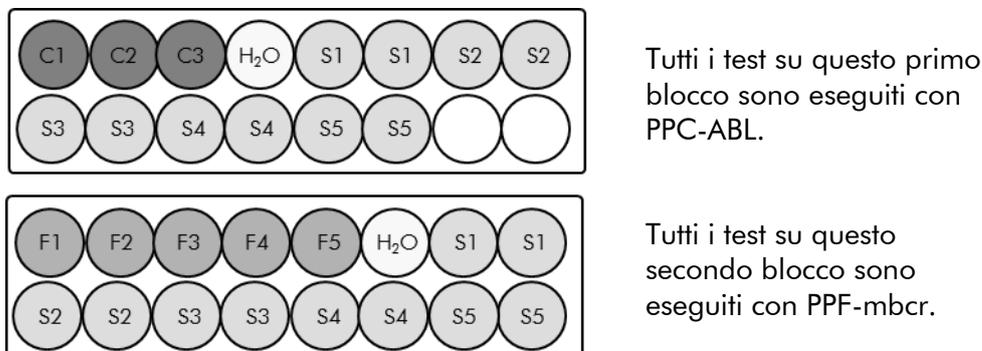


Figura 6. Configurazione della piastra consigliata per un esperimento. S: campione di cDNA; F1–5: standard BCR-ABL mbc r; C1–3: standard ABL; H₂O: acqua come materiale di controllo.

qPCR sullo strumento SmartCycler

Nota: Eseguire tutte le fasi su ghiaccio.

Procedura

1. **Scongelare tutti i componenti necessari e collocarli su ghiaccio.**
2. **Preparare la seguente miscela qPCR a seconda del numero di campioni da analizzare.**

Tutte le concentrazioni sono calcolate sul volume finale di reazione.

La tabella 14 mostra lo schema di pipettatura per la preparazione di una miscela di reagenti, calcolata per ottenere un volume di reazione finale di 25 μ l. È possibile preparare una premiscela, a seconda del numero di reazioni, utilizzando la medesima miscela di primer e sonda (PPC-ABL o PPF-mbcr). Sono inclusi volumi extra per compensare eventuali errori di pipettatura.

Tabella 14. Preparazione della miscela qPCR

Componente	1 reazione (μl)	ABL: 14+1 reazioni (μl)	BCR-ABL mbcr: 16+1 reazioni (μl)	Concentrazione finale
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Miscela di primer e sonda, 25x	1	15	17	1x
Acqua per PCR priva di nucleasi	6,5	97,5	110,5	–
Campione (da aggiungere alla fase 4)	5	5 ciascuno	5 ciascuno	–
Volume totale	25	25 ciascuno	25 ciascuno	–

3. **Dispensare 20 μ l della premiscela qPCR in ogni pozzetto.**
4. **Aggiungere 5 μ l del prodotto RT (cDNA, equivalente a 100 ng di RNA) ottenuto nella trascrittasi inversa (vedere "Protocollo: Trascrittasi inversa EAC standardizzata consigliata", pag. 12) nella provetta corrispondente (volume totale 25 μ l).**
5. **Miscelare delicatamente aspirando e rilasciando con una pipetta.**
6. **Caricare i campioni nel termociclatore secondo le istruzioni del produttore.**
7. **Programmare lo strumento SmartCycler con il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 15.**

Tabella 15. Profilo termico

Mantenimento	Temperatura: 50°C Durata: 2 minuti
Mantenimento 2	Temperatura: 95°C Durata: 10 minuti
Ciclizzazione	50 volte 95°C per 15 secondi 60°C per 1 minuto con acquisizione: singolo

8. **Si consiglia di impostare la soglia a 30. Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 15.**

Interpretazione dei risultati

Principio di analisi dei dati

Nella tecnologia TaqMan, il numero di cicli della PCR necessari alla rilevazione di un segnale oltre la soglia è chiamato ciclo soglia (C_T) ed è direttamente proporzionale alla quantità di materiale bersaglio presente all'inizio della reazione.

Usando campioni standard con un numero noto di molecole è possibile determinare una curva standard e stabilire la precisa quantità di materiale bersaglio presente nel campione di analisi. Le curve standard di *ipsogen* si basano su plasmidi; si utilizzano 3 diluizioni standard di plasmidi per CG e 5 diluizioni standard per FG per garantire curve standard accurate. Le Figure 7 e 8 mostrano un esempio di curve di amplificazione TaqMan ottenute con il kit *ipsogen* BCR-ABL mbc.

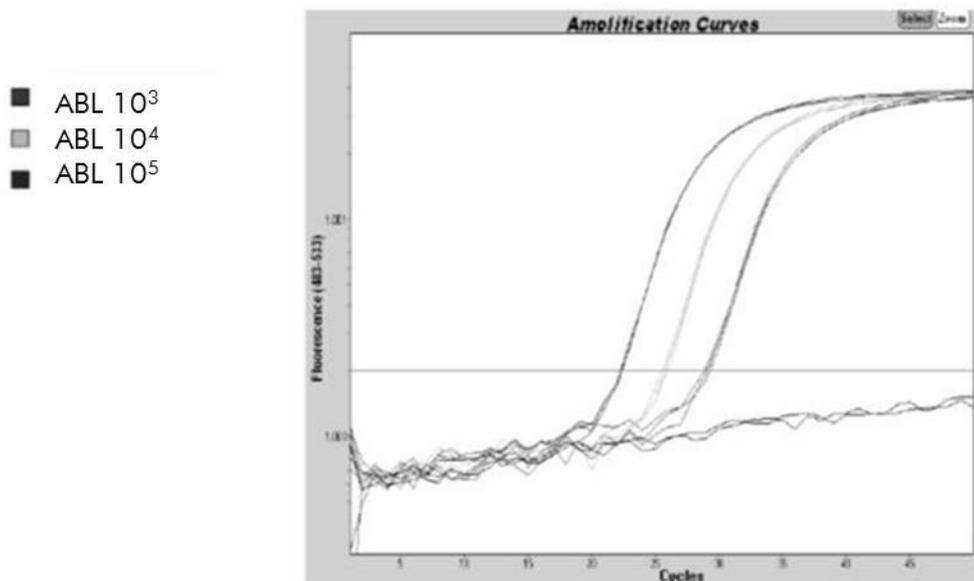


Figura 7. Rilevazione degli standard ABL (C1, C2, C3). 10³, 10⁴ e 10⁵ copie/5 μ l.

- m-bcr 10^1
- m-bcr 10^2
- m-bcr 10^3
- m-bcr 10^5
- m-bcr 10^6

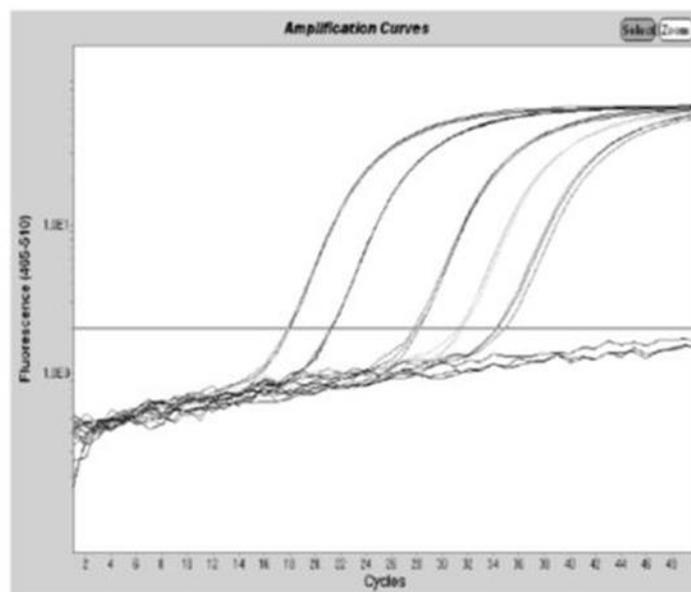


Figura 8. Rilevazione degli standard BCR-ABL mbc (F1–F5). 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 copie/5 μ l.

Risultati

Curva standard e criteri di qualità

I dati non elaborati possono essere incollati in un file Excel® per l'analisi.

Per ogni gene (ABL e BCR-ABL), i valori C_T non elaborati, ottenuti dalle diluizioni standard di plasmidi, vengono rappresentati su un grafico in funzione del logaritmo del numero di copie (3, 4 e 5 per C1, C2 e C3; 1, 2, 3, 5 e 6 per F1, F2, F3, F4 e F5). La Figura 9 mostra un esempio della curva teorica calcolata con 5 diluizioni standard.

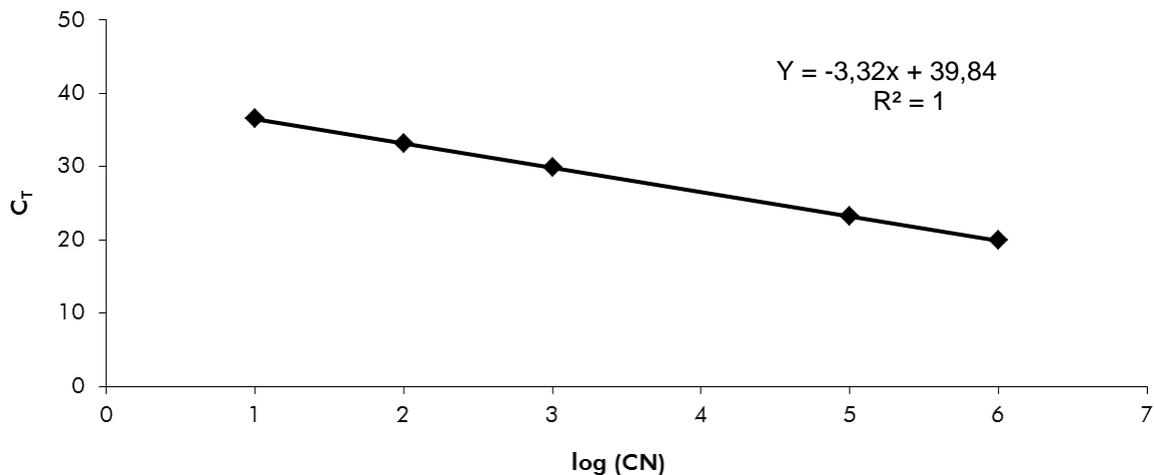


Figura 9. Curva teorica calcolata con 5 diluizioni standard. Si calcola una curva di regressione lineare ($y = ax + b$) per ogni gene (ABL e BCR-ABL), dove a è la pendenza della linea e b è l'intercetta y , ossia la coordinata y del punto in cui la linea attraversa l'asse y . La relativa equazione e il coefficiente di determinazione (R^2) sono riportati nel grafico.

Poiché gli standard sono stati diluiti dieci volte, la pendenza teorica della curva è $-3,3$. Una pendenza tra $-3,0$ e $-3,9$ può essere accettabile, posto che R^2 sia $>0,95$ (2). Tuttavia, un valore di $R^2 >0,98$ è auspicabile per ottenere risultati precisi (3).

Numero di copie normalizzato (NCN)

L'equazione della curva standard ABL deve essere utilizzata per trasformare i valori C_T non elaborati (ottenuti con PPC-ABL) dei campioni sconosciuti in numeri di copie ABL (ABL_{CN}).

L'equazione della curva standard BCR-ABL deve essere utilizzata per trasformare i valori C_T non elaborati (ottenuti per PPF-mbcr) dei campioni sconosciuti in numeri di copie BCR-ABL ($BCR-ABL_{mbcr_{CN}}$).

Il rapporto fra questi valori CN dà il numero di copie normalizzato (NCN):

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

Valore MRD

Il valore della malattia minima residua (MRD) è il rapporto fra l'espressione normalizzata CG dell'FG nei campioni di follow-up ($(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$) e nei campioni diagnostici ($(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$).

$$\text{Valore MRD (MRD}_v\text{)} = \frac{(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}}{(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}}$$

Sensibilità

La sensibilità (SENS_v) è il rapporto fra l'espressione relativa dell'FG alla diagnosi (FG_{CN}/CG_{CN})_{DX} e l'espressione CG (CG_{CN,FUP}) nel campione di follow-up.

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

Controllo qualità sui valori ABL

Una scarsa qualità dell'RNA o problemi intervenuti durante le fasi di qPCR producono un ridotto ABL_{CN}. Si consiglia di scartare i risultati di campioni che presentano ABL_{CN} < 1318 (valore inferiore dell'IC al 95% ottenuto da campioni di pazienti nello studio EAC, riferimento bibliografico 4).

Riproducibilità tra replicati

La variazione dei valori C_T tra i replicati deve essere <2, il che corrisponde ad una variazione quadrupla dei valori dei numeri di copie.

La variazione dei valori C_T tra i replicati è generalmente <1,5 se il valore C_T medio dei replicati è <36 (2).

Nota: Ogni utente deve misurare la propria riproducibilità in laboratorio.

Acqua come materiale di controllo

In caso di controlli negativi, CN deve essere pari a zero.

Un controllo acqua positivo è il risultato di una contaminazione crociata. Per trovare una soluzione, vedere la seguente sezione "Guida alla risoluzione dei problemi".

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per chiarire eventuali dubbi che possano presentarsi. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti addetti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN sono sempre lieti di rispondere a qualsiasi domanda possiate avere, per quanto riguarda le informazioni ed i protocolli presenti in questo manuale, oppure le tecnologie per campioni e test (per le informazioni sui contatti, consultare "Informazioni sui contatti", pagina 46).

Commenti e suggerimenti

Risultato negativo per il gene di controllo (ABL) e BCR-ABL mbcr in tutti i campioni — standard corretto

- a) Scarsa qualità dell'RNA Verificare sempre la qualità e la concentrazione dell'RNA prima di cominciare.
Eeguire in parallelo un test con un controllo positivo dell'RNA della linea cellulare (controllo altamente positivo nel kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls, cat. n° 670091).
- b) Errore della fase di trascrittasi inversa Verificare sempre la qualità e la concentrazione dell'RNA prima di cominciare.
Eeguire in parallelo un test con un controllo positivo dell'RNA della linea cellulare (kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls, cat. n° 670091).

Risultato negativo per il gene di controllo (ABL) nei campioni — standard corretto

- a) Scarsa qualità dell'RNA Verificare sempre la qualità e la concentrazione dell'RNA prima di cominciare.
Eeguire in parallelo un test con un controllo positivo dell'RNA della linea cellulare (kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls, cat. n° 670091).
- b) Errore della fase di trascrittasi inversa Verificare sempre la qualità e la concentrazione dell'RNA prima di cominciare.
Eeguire in parallelo un test con un controllo positivo dell'RNA della linea cellulare (kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr Controls, cat. n° 670091).

Segnale negativo dello standard

- a) Errore di pipettatura Controllare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione.
Ripetere la sequenza PCR.

Commenti e suggerimenti

- b) Conservazione inadeguata dei componenti del kit
- Conservare il kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbcR a una temperatura compresa tra -15°C e -30°C e mantenere le miscele di primer e sonda (PPC e PPF) lontane dalla luce. Vedere "Conservazione e manipolazione dei reagenti", pag. 10.
- Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti.
- Conservare i reagenti in aliquote.

I controlli negativi sono positivi

- Contaminazione crociata
- Sostituire tutti i reagenti interessati.
- Ripetere l'esperimento con nuove aliquote di tutti i reagenti.
- Manipolare sempre i campioni, i componenti del kit e i materiali di consumo secondo le pratiche comunemente accettate per evitare contaminazione crociata.

Nessun segnale, anche nei controlli standard

- a) Errore di pipettatura o reagenti mancanti
- Controllare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione.
- Ripetere la sequenza PCR.
- b) Effetti inibitori del materiale campione causati da insufficiente purificazione
- Ripetere la preparazione dell'RNA.
- c) LightCycler: selezionato canale di rilevazione errato
- Impostare il canale a F1/F2 o 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: nessuna acquisizione dati programmata
- Controllare i programmi del ciclo.
- Selezionare la modalità di acquisizione "single" (singola) al termine di ogni segmento di ibridazione del programma PCR.

Commenti e suggerimenti

Segnale assente o basso nei campioni, ma controlli standard corretti

- a) Scarsa qualità o bassa concentrazione dell'RNA Verificare sempre la qualità e la concentrazione dell'RNA prima di cominciare.
Eseguire in parallelo un test con un controllo positivo dell'RNA della linea cellulare (kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Controls, cat. n° 670091).
- b) Errore della fase di trascrittasi inversa Verificare sempre la qualità e la concentrazione dell'RNA prima di cominciare.
Eseguire in parallelo un test con un controllo positivo dell'RNA della linea cellulare (kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbc Controls, cat. n° 670091).

Intensità di fluorescenza troppo bassa

- a) Conservazione inadeguata dei componenti del kit Conservare il kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbc a una temperatura compresa tra -15°C e -30°C e mantenere le miscele di primer e sonda (PPC e PPF) lontane dalla luce. Vedere "Conservazione e manipolazione dei reagenti", page 10.
Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti.
Conservare i reagenti in aliquote.
- b) Quantità iniziale di RNA bersaglio molto bassa Aumentare la quantità di RNA campione.
Nota: possono verificarsi effetti inibitori a seconda del metodo di preparazione dell'RNA selezionato.

LightCycler: Variazioni dell'intensità di fluorescenza

- a) Errore di pipettatura La variabilità causata dal cosiddetto "errore di pipettatura" può essere ridotta analizzando i dati in modalità F1/F2 o 530 nm/640 nm.
- b) Centrifugazione insufficiente dei capillari La miscela PCR preparata potrebbe essere rimasta nella parte superiore del capillare oppure potrebbe esservi una bolla d'aria nella punta del capillare.
Centrifugare sempre i capillari carichi con la miscela di reazione come descritto nel manuale operativo specifico dell'apparecchiatura.

Commenti e suggerimenti

- c) Superficie esterna della punta del capillare sporca Indossare sempre i guanti durante la manipolazione dei capillari.

LightCycler: Errore della curva standard

- Errore di pipettatura La variabilità causata dal cosiddetto "errore di pipettatura" può essere ridotta analizzando i dati in modalità F1/F2 o 530 nm/640 nm.

Controllo qualità

L'intero kit è stato sottoposto a controllo di qualità sullo strumento LightCycler 480. Il kit è stato prodotto in conformità con lo standard ISO 13485:2003. I certificati di analisi sono disponibili inviando una richiesta a www.qiagen.com/support/.

Limiti della metodica

Gli utilizzatori del kit devono essere adeguatamente formati e avere acquisito dimestichezza con questa tecnica prima di iniziare a usare il dispositivo.

Gli eventuali risultati diagnostici generati dal sistema devono essere interpretati in combinazione con gli esiti di altri esami clinici o di laboratorio. È responsabilità dell'utilizzatore convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia coperta dagli studi di valutazione delle prestazioni QIAGEN.

Rispettare le date di scadenza dei singoli componenti, riportate sulla confezione e sulle etichette. Non utilizzare reagenti scaduti.

Nota: Il kit è stato prodotto secondo gli studi "Europe Against Cancer" (EAC) (Europa contro il cancro) (4) ed è conforme alle raccomandazioni internazionali aggiornate (3, 5). Il kit deve essere impiegato seguendo le istruzioni fornite nel presente manuale, assieme ai reagenti e agli strumenti approvati (vedere "Materiali necessari ma non in dotazione", pag. 8). Qualsiasi impiego non previsto del prodotto e/o alterazione dei componenti esenteranno QIAGEN da qualsiasi responsabilità.

Caratteristiche delle prestazioni

Studi non clinici

Materiali e metodi

La valutazione delle prestazioni è stata eseguita sullo strumento ABI PRISM 7700 SDS, in combinazione con i reagenti elencati nella sezione "Materiali necessari ma non in dotazione", pag. 8. Studi di equivalenza ne hanno convalidato l'uso sui seguenti strumenti: ABI PRISM 7000 e 7900HT SDS, LightCycler 1.2 e 480, Rotor-Gene 3000 e SmartCycler (6).

Sono stati condotti studi non clinici per stabilire le prestazioni analitiche del kit *ipsogen* BCR-ABL1 mbc. Questi studi di laboratorio non clinici sono stati effettuati sull'RNA totale di una linea cellulare TOM1 diluita in una quantità finale costante di RNA totale della linea cellulare MV4-11.

Per stabilire la ripetibilità del test sono state analizzate 5 diverse concentrazioni di RNA totale di TOM1 (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg e 0,5 pg) diluite in RNA totale di MV4-11, in una quantità totale finale costante di 1000 ng, in 5 replicati per ogni seduta di analisi e in 4 diverse sedute di analisi (Figura 10).

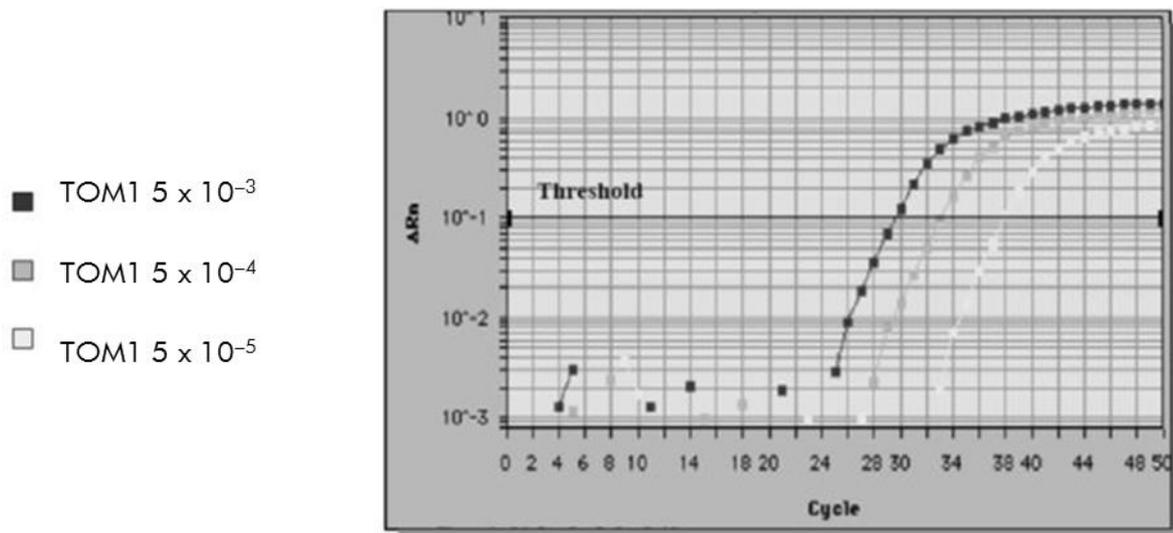


Figura 10. Grafici di amplificazione di 5 diluizioni da 10^{-3} (5 ng), 5 da 10^{-4} (0,5 ng) e 5 da 10^{-5} (0,05 ng) di RNA totale di TOM1 in RNA totale negativo di MV4-11.

Dati analitici

Le Tabelle 16–19 mostrano le analisi inter-test con il ciclo soglia medio (C_T), la deviazione standard (DS), il numero di campioni (n), il coefficiente di variazione (CV), il numero di copie medio (CN) e il numero di copie normalizzato medio (NCN).

Tabella 16. Analisi inter-test — linee cellulari mbc r e ABL

Linea cellulare	Diluizione	C _T medio	DS	n	CV (%)
mbcr	5 x 10 ⁻³ (5 ng/1 μg)	29,19	0,26	20	0,88
	5 x 10 ⁻⁴ (0,5 ng/1 μg)	33,70	0,48	20	1,47
	5 x 10 ⁻⁵ (0,05 ng/1 μg)	37,03	1,16	20	3,15
ABL	–	25,01	0,87	100	3,46

Tabella 17. Analisi inter-test — plasmidi

Gene	Plasmide	C _T medio	DS	n	CV (%)
mbcr	F1 (10 ¹ copie)	35,19	0,90	11	2,57
	F2 (10 ² copie)	31,87	0,64	12	1,99
	F3 (10 ³ copie)	28,41	0,71	12	2,50
	F4 (10 ⁵ copie)	21,48	0,59	12	2,76
	F5 (10 ⁶ copie)	18,37	0,71	12	3,89
ABL	C1 (10 ³ copie)	29,68	0,85	12	2,86
	C2 (10 ⁴ copie)	26,01	0,51	12	1,96
	C3 (10 ⁵ copie)	22,53	0,42	12	1,86

Tabella 18. Analisi inter-test — linee cellulari BCR-ABL mbcr e ABL (CN medio)

Linea cellulare	Diluizione	CN medio	DS	n	CV (%)
BCR-ABL mbcr	5×10^{-3} (5 ng/1 μ g)	587,30	194,10	20	33,05
	5×10^{-4} (0,5 ng/1 μ g)	57,84	20,38	20	35,23
	5×10^{-5} (0,05 ng/1 μ g)	4,39	2,73	20	62,35
ABL	–	22.038,22	9.459,17	100	42,92

Tabella 19. Analisi inter-test — linea cellulare BCR-ABL mbcr (NCN medio)

Linea cellulare	Diluizione	NCN medio*	DS	n	CV (%)
BCR-ABL mbcr	5×10^{-3} (5 ng/1 μ g)	267,46	93,22	20	34,85
	5×10^{-4} (0,5 ng/1 μ g)	23,54	7,36	20	31,28
	5×10^{-5} (0,05 ng/1 μ g)	2,60	2,80	20	107,66

* Solo per questi risultati di studio, l'NCN si calcola con la formula

$$\frac{\text{BCR-ABL mbcr}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10.000.$$

Studi clinici

La valutazione delle prestazioni è stata eseguita sullo strumento ABI PRISM 7700 SDS, in combinazione con i reagenti elencati nella sezione "Materiali necessari ma non in dotazione", pag. 8. Studi di equivalenza ne hanno convalidato l'uso sui seguenti strumenti: ABI PRISM 7000 e 7900HT SDS, LightCycler 1.2 e 480, Rotor-Gene 3000 e SmartCycler (6).

26 laboratori in 10 paesi europei si sono organizzati in un'azione concertata chiamata "Europe Against Cancer (EAC)" (Europa contro il cancro) e hanno utilizzato i plasmidi messi a disposizione da IPSOGEN per definire un protocollo standardizzato per l'analisi qPCR dei principali geni di fusione associati alla leucemia in strutture cliniche. Il trascritto BCR-ABL p190 è stato uno dei geni di fusione (FG) inclusi nello studio. In questa sezione presentiamo

un riepilogo di questo studio di convalida; i risultati completi sono stati pubblicati nel 2003 (4, 7).

Riproducibilità interlaboratorio per gli standard plasmidici CG e FG

Undici laboratori hanno eseguito un esperimento di riproducibilità interlaboratorio per valutare la variabilità della misurazione delle diluizioni standard dei plasmidi CG e FG. Le diluizioni sono state analizzate in duplicato presso ogni struttura. La Tabella 20 mostra la deviazione standard media e il CV (%) per ogni diluizione.

Tabella 20. Riproducibilità interlaboratorio per gli standard plasmidici CG e FG

Gene	Diluizione	Media	DS C _T	CV (%)
Gene di controllo ABL	C1	29,04	0,53	1,82
	C2	25,64	0,47	1,84
	C3	22,10	0,34	1,55
Gene di fusione BCR-ABL mbc	F1	35,99	1,18	3,28
	F2	32,05	0,74	2,32
	F3	28,43	0,65	2,29
	F4	21,60	0,59	2,72
	F5	18,24	0,46	2,57

Valori di espressione del trascritto FG BCR-ABL mbc

La Tabelle 21 e 22 mostrano i valori di espressione del trascritto FG BCR-ABL mbc e ABL CG, per la linea cellulare TOM1, per i pazienti ALL alla diagnosi e i pazienti normali.

Tabella 21. Valori di espressione del trascritto FG BCR-ABL mbc r e ABL CG — valori C_T

	Valori C _T (intervallo al 95%)	
	BCR-ABL mbc r	ABL
Linea cellulare TOM1	22.8	21.8
Campioni dei pazienti ALL		
BM (n = 17)	24,7 (21,3–27,1)	24,5 (21,7–27,1)
PB (n = 7)	23,3 (21,7–29,1)	22,5 (21,0–27,0)
Campioni negativi dei pazienti		
BM (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
PB (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

Tabella 22. Valori di espressione del trascritto FG BCR-ABL mbc r e ABL CG — valori CN e NCN

	Valori CN (intervallo al 95%)		Valori NCN (intervallo al 95%)
	BCR-ABL mbc r	ABL	CN BCR-ABL mbc r/CN ABL
Campioni dei pazienti ALL			
BM (n = 17)	9.550 (1.738–97.724)	11.912 (5012–70.795)	0,8 (0,35–1,38)
PB (n = 7)	91.201 (1.905– 208.930)	134.896 (4.786–114.815)	0,68 (0,4–1,82)
Campioni negativi dei pazienti			
BM (n = 26)	–	19.201 (12.922–25.480)	–
PB (n = 74)	–	21.136 (17.834–24.437)	–

I valori C_T ABL non presentano differenze significative fra i campioni normali e leucemici, né fra i tipi di campioni (PB o BM) o i campioni di leucemia (ALL, AML, CML).

Quote di falsi positivi e falsi negativi

I falsi negativi e i falsi positivi sono stati calcolati utilizzando i seguenti controlli.

- Controlli positivi: cellule TOM1, una linea cellulare ben nota per la sua positività per il gene di fusione BCR-ABL p190; campioni di pazienti già valutati per la positività p190
- Controlli negativi: campioni di RNA negativi, controlli di assenza di amplificazione (NAC), costituiti da RNA di *E. coli* invece che RNA umano per controllare la presenza di contaminazione della PCR, e controlli no template (NTC) contenenti acqua al posto di RNA umano

L'amplificazione sui campioni di RNA dell'FG è stata eseguita in triplicato e in duplicato per il CG.

Un campione di RNA positivo viene definito come falso negativo se ha meno del 50% di pozzetti positivi (0/2, 0/3 o 1/3).

Un campione di RNA negativo viene definito come falso positivo se ha almeno il 50% di pozzetti positivi (2/2, 0/3 o 1/3).

La Tabella 23 mostra il numero e la percentuale di campioni falsi negativi e falsi positivi.

Tabella 23. Campioni falsi negativi e falsi positivi

Falsa negatività		Falsa positività	
10^{-3}	10^{-4}	Controllo negativo FG	NAC/NTC
0% (0/54)	4% (3/75)	4,8% (6/126)	5,8% (7/120)

Bibliografia

QIAGEN possiede un'ampia banca dati online continuamente aggiornata con le pubblicazioni scientifiche riguardanti i prodotti QIAGEN. Le opzioni di ricerca specifiche consentono di trovare gli articoli necessari sia tramite parole chiave sia specificando l'applicazione, l'area di ricerca, il titolo, ecc.

Per un elenco bibliografico completo, visitare il sito QIAGEN Reference Database www.qiagen.com/RefDB/search.asp oppure contattare il centro di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale.

Riferimenti citati

1. Thomas, D.A. (2007) Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukemia: a new era of challenges. Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program **2007**, 435.
2. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and van Dongen, J.J. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia **17**, 1013.
3. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. Leukemia **20**, 1925.
4. 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.
5. Hughes, T. et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood **108**, 28.
6. Silvy, M., Mancini, J., Thirion, X., Sigaux, F., and Gabert, J. (2005) Evaluation of real-time quantitative PCR machines for the monitoring of fusion gene transcripts using the Europe against cancer protocol. Leukemia **19**, 305.
7. 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.

Simboli

Sulla confezione o sull'etichettatura possono comparire i seguenti simboli:



<N>

Il kit contiene reagenti sufficienti per <N> reazioni



Data di scadenza



Dispositivo medico per diagnostica in vitro



Numero di catalogo

	Numero di lotto
	Numero di materiale
	Global Trade Item Number
	Limite di temperatura
	Produttore
	Fare riferimento alle informazioni riportate nel manuale

Informazioni sui contatti

Per ricevere assistenza tecnica e ulteriori informazioni, consultate il nostro sito www.qiagen.com/Support, chiamare il numero 00800-22-44-6000 oppure contattate il servizio di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale (consultate il retro della copertina o il sito www.qiagen.com).

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Indice	Cat. n°
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbcr Kit (24)	Per 24 reazioni: standard del gene di controllo ABL, standard del gene di fusione BCR-ABL mbcr, miscela di primer e sonda ABL, miscela di primer e sonda gene di fusione BCR-ABL mbcr	670023
Rotor-Gene Q MDx — per analisi della PCR in tempo reale convalidata per IVD in applicazioni cliniche		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e materiali, installazione e addestramento non inclusi	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e materiali, installazione e addestramento	9002033
Kit <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbcr Controls — per la convalida qualitativa dell'estrazione dell'RNA e la trascrittasi inversa del gene di fusione BCR-ABL mbcr		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbcr Controls Kit	Linee cellulari con espressione negativa, elevata e debolmente positiva del gene di fusione BCR-ABL mbcr	670091

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il manuale del kit QIAGEN specifico o il manuale utente. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili nel sito www.qiagen.com, oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al proprio distributore locale.

Questo prodotto è destinato all'uso diagnostico in vitro. I prodotti *ipsogen* non possono essere rivenduti, modificati per la rivendita o impiegati per la realizzazione di prodotti commerciali senza il consenso scritto di QIAGEN.

Le informazioni contenute in questo documento sono soggette a modifiche senza preavviso. QIAGEN non si assume responsabilità per errori eventualmente riscontrati in questo documento. Questo documento è considerato completo e accurato al momento della pubblicazione. In nessun caso QIAGEN potrà essere ritenuta responsabile di danni accidentali, particolari, multipli o secondari in relazione all'impiego di questo documento o derivanti da quest'ultimo.

I prodotti *ipsogen* sono garantiti conformi alle specifiche indicate. L'unico obbligo di QIAGEN, e l'unico rimedio a cui ha diritto il cliente, è la sostituzione gratuita dei prodotti in caso gli stessi non offrano le prestazioni richieste.

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

Contratto di Licenza Limitato

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del kit *ipsogen* BCR-ABL1 *mbc* alle seguenti condizioni:

1. Il kit *ipsogen* BCR-ABL1 *mbc* deve essere usato unicamente secondo le istruzioni contenute nel *Manuale del kit ipsogen BCR-ABL1 mbc* e in combinazione con i componenti contenuti nel kit. QIAGEN non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, per l'uso o l'aggiunta dei componenti del kit ad altri componenti non contenuti nel kit, ad eccezione di quanto descritto nel *Manuale del kit ipsogen BCR-ABL1 mbc* e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com.
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, QIAGEN non garantisce in alcun modo che questi kit e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Il presente kit ed i relativi componenti sono concessi in licenza per l'impiego monouso e non possono essere riutilizzati, ripristinati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit concordano nel non compiere e nel non consentire ad altri di compiere o contribuire a compiere azioni proibite. QIAGEN può imporre presso qualunque tribunale i divieti del presente Contratto di Licenza Limitato, e recupererà tutte le spese di indagine e spese legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di Licenza Limitato o qualsiasi diritto di proprietà intellettuale correlato al kit e/o ai suoi componenti.

Per le condizioni di licenza aggiornate, consultare il sito www.qiagen.com.

HB-1357-002 © 2013–2015 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

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

