

# Manuale del kit *ipsogen*<sup>®</sup> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR



Versione 1

**IVD**

Diagnostica quantitativa in vitro

Da utilizzare con gli strumenti Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, Applied Biosystems<sup>®</sup>, ABI PRISM<sup>®</sup> e LightCycler<sup>®</sup>



**REF** 670723



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
GERMANIA

**R3** **MAT** 1072509IT



## **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](http://www.qiagen.com)**.

# Indice

<b>Uso previsto</b>	<b>5</b>
<b>Sommario e spiegazioni</b>	<b>5</b>
Informazioni sulla CML	5
Monitoraggio della malattia	5
<b>Principio della procedura</b>	<b>7</b>
<b>Materiali in dotazione</b>	<b>10</b>
Contenuto del kit	10
<b>Materiali necessari ma non in dotazione</b>	<b>11</b>
<b>Avvertenze e precauzioni</b>	<b>12</b>
Precauzioni generali	13
<b>Conservazione e manipolazione dei reagenti</b>	<b>13</b>
<b>Conservazione e manipolazione dei campioni</b>	<b>14</b>
<b>Procedura</b>	<b>14</b>
Preparazione dell'RNA dai campioni	14
Protocolli	
■ Trascrittasi inversa utilizzando SuperScript III Reverse Transcriptase	14
■ qPCR su strumenti Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o Rotor-Gene Q 5plex HRM con rotore a 72 provette	18
■ qPCR su Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System e strumenti ABI PRISM 7900HT SDS e LightCycler 480	22
■ qPCR su strumenti LightCycler 1.2, 1.5 e 2.0	28
<b>Interpretazione dei risultati</b>	<b>32</b>
Principio di analisi dei dati	32
Curve standard e criteri di qualità applicabili ai dati non elaborati	33
Numero di copie normalizzato (NCN)	35
Conversione sulla scala IS e determinazione della MMR (risposta molecolare maggiore)	36
Riepilogo dei criteri di qualità	37
Risoluzione dei problemi	38
<b>Controllo qualità</b>	<b>39</b>
<b>Limiti della metodica</b>	<b>39</b>
<b>Caratteristiche delle prestazioni</b>	<b>39</b>

Limite del bianco e limite di rilevabilità	40
Linearità	40
Quantità immesse	40
Precisione	40
Studio sulla concordanza: Confronto tra gli standard plasmide singolo ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM) e plasmide singolo <i>ipsogen</i> (QIAGEN).	41
<b>Bibliografia</b>	<b>43</b>
<b>Simboli</b>	<b>44</b>
<b>Informazioni sui contatti</b>	<b>44</b>
<b>Informazioni per gli ordini</b>	<b>45</b>

## Uso previsto

Il kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR è destinato alla quantificazione dei trascritti BCR-ABL p210 b2a2 o b3a2 in campioni di midollo osseo (BM) o sangue periferico (PB) di pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta (ALL) o leucemia mieloide cronica (CML), a cui è stato precedentemente diagnosticato un evento di fusione genica (FG) BCR-ABL Mbc. Il test è concepito per valutare il livello di risposta molecolare; i risultati possono essere utilizzati nel follow-up per studiare la malattia minima residua (MRD).

## Sommario e spiegazioni

### Informazioni sulla CML

La CML appartiene al gruppo delle neoplasie mieloproliferative e in oltre il 90% dei casi è caratterizzata dalla presenza del cromosoma Philadelphia (cromosoma Ph).

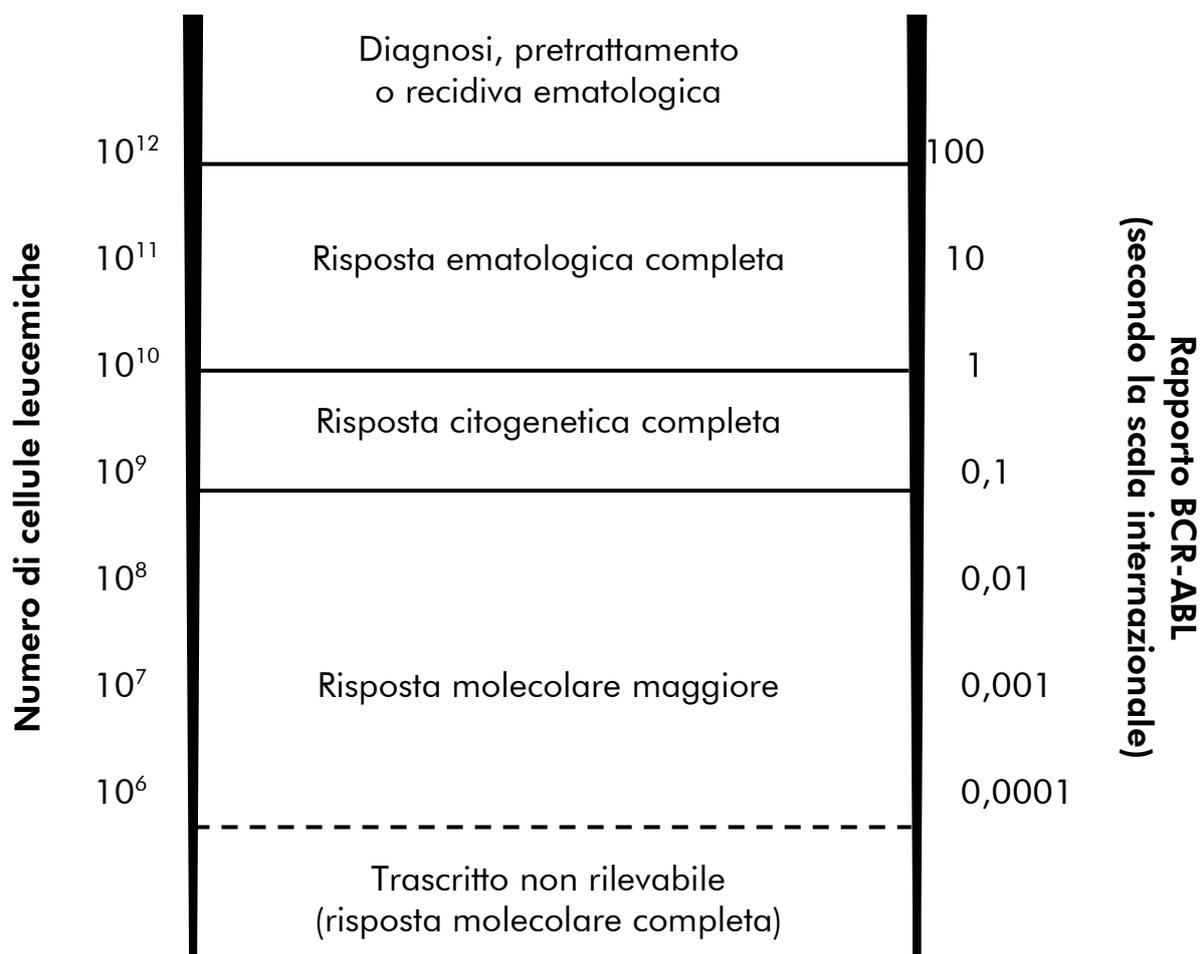
Questo cromosoma è il risultato di una traslocazione reciproca fra i bracci lunghi dei cromosomi 9 e 22, t(9;22): la BCR, ossia la regione di raggruppamento dei punti di rottura, è localizzata sul cromosoma 22, mentre l'oncogene c-ABL si trova sul cromosoma 9. Il corrispondente gene di fusione, BCR-ABL, viene trascritto in un mRNA di 8,5 kb, con 2 varianti di giunzione b2a2 (40% dei casi) e b3a2 (55% dei casi). Tale gene codifica per una proteina chimerica, p210, che presenta elevata attività tirosin-chinasica. I trascritti b2a3 e b3a3 rappresentano meno del 5% dei casi. Un cromosoma Ph può essere rilevato anche nel 35% dei pazienti adulti affetti da ALL.

L'incidenza annuale della CML è di circa 1–2 su 100.000, e la CML è responsabile del 20% delle leucemie dell'adulto. Clinicamente, è caratterizzata da un eccessivo numero di cellule mieloidi che si differenziano e funzionano normalmente. Nel 90–95% dei casi, la diagnosi di CML viene posta quando la malattia è in stadio cronico o stabile. Dopo un periodo che varia in media da 4 a 6 anni, i pazienti entrano in una fase accelerata che evolve in crisi blastica e leucemia acuta, spesso con esito fatale. L'avvento di imatinib e più precisamente degli inibitori tirosin-chinasici (TKI) di seconda generazione ha profondamente mutato il decorso naturale della malattia: ora i pazienti rimangono in gran parte in remissione e devono essere sottoposti ad un follow-up e ad un monitoraggio della malattia a lungo termine.

### Monitoraggio della malattia

Ad oggi, l'obiettivo della terapia della CML è raggiungere la sopravvivenza totale e la negatività del cromosoma Ph. Il monitoraggio della malattia è quindi uno strumento fondamentale per valutare la risposta al trattamento e rilevare

recidive precoci per ogni singolo paziente. In terapia con TKI, la malattia evolve di norma dalla remissione ematologica a quella citogenetica e, infine, a quella molecolare; ciò corrisponde ad una riduzione del numero di cellule leucemiche e di trascritti BCR-ABL, come specificato nella Figura 1 qui di seguito.



**Figura 1. Adattato dal riferimento bibliografico 1.**

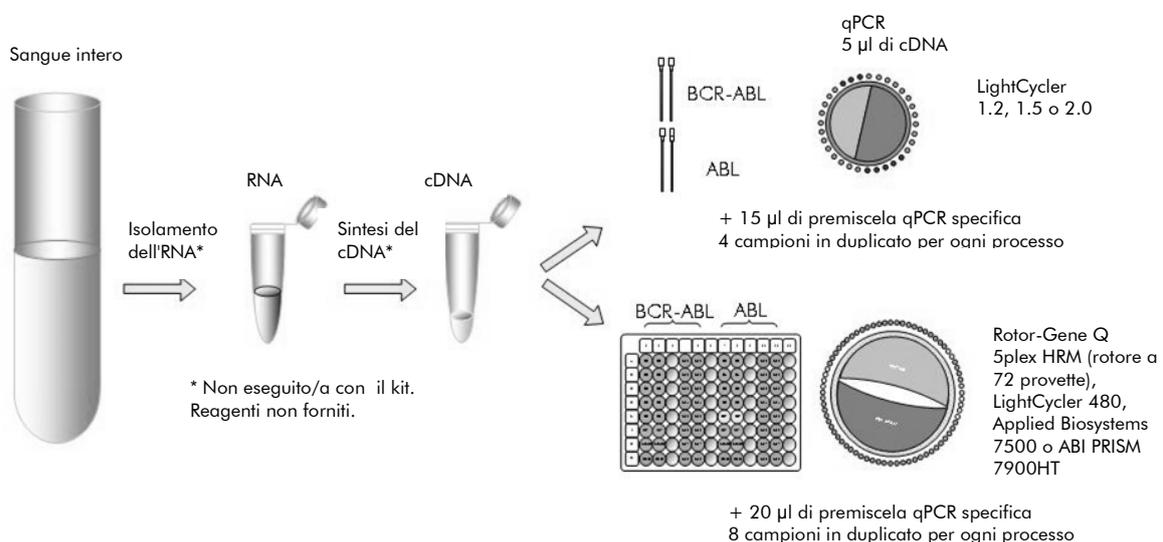
Il metodo standard per stimare il carico tumorale nei pazienti CML è l'analisi citogenetica convenzionale (G-banding) su metafasi di midollo osseo (BM). La risposta citogenetica viene valutata almeno su 20 metafasi di midollo. Il livello di risposta citogenetica è stimata sulla percentuale di metafasi positive per il cromosoma Ph (vedere la Tabella 1, riferimento bibliografico 2). Tuttavia, questa valutazione dipende dalle prestazioni di laboratorio e presenta una bassa sensibilità, pari al 5% quando si analizzano 20 metafasi.

La reazione quantitativa a catena della polimerasi (qPCR) in tempo reale, che consente di quantificare l'mRNA del trascritto BCR-ABL M<sub>bcr</sub> su campioni di sangue periferico (PB), fa ormai parte delle tecniche di monitoraggio della malattia in pazienti CML sottoposti a trattamento. È meno invasiva e più sensibile dell'analisi citogenetica convenzionale delle metafasi del midollo osseo.

Di recente, sono state anche aggiornate le raccomandazioni per il monitoraggio della CML. In particolare, sono state integrate nuove evidenze cliniche di studi clinici e sono stati migliorati gli obiettivi e gli strumenti di monitoraggio della malattia. Gran parte delle raccomandazioni sulla definizione della risposta e sul monitoraggio dei pazienti trattati con imatinib sono state formulate dagli esperti dell'ELN (European Leukemia Network) (2).

Da un punto di vista tecnico, gli esperti internazionali si sono impegnati ad armonizzare l'analisi e la determinazione dei trascritti BCR-ABL Mbc (3–5). Inoltre, è stato recentemente convalidato un pool di riferimento sotto l'egida dell'OMS per consentire una semplice standardizzazione della quantificazione dei trascritti BCR-ABL (6).

## Principio della procedura



**Figura 2. Isolamento dell'RNA, sintesi del cDNA e qPCR.**

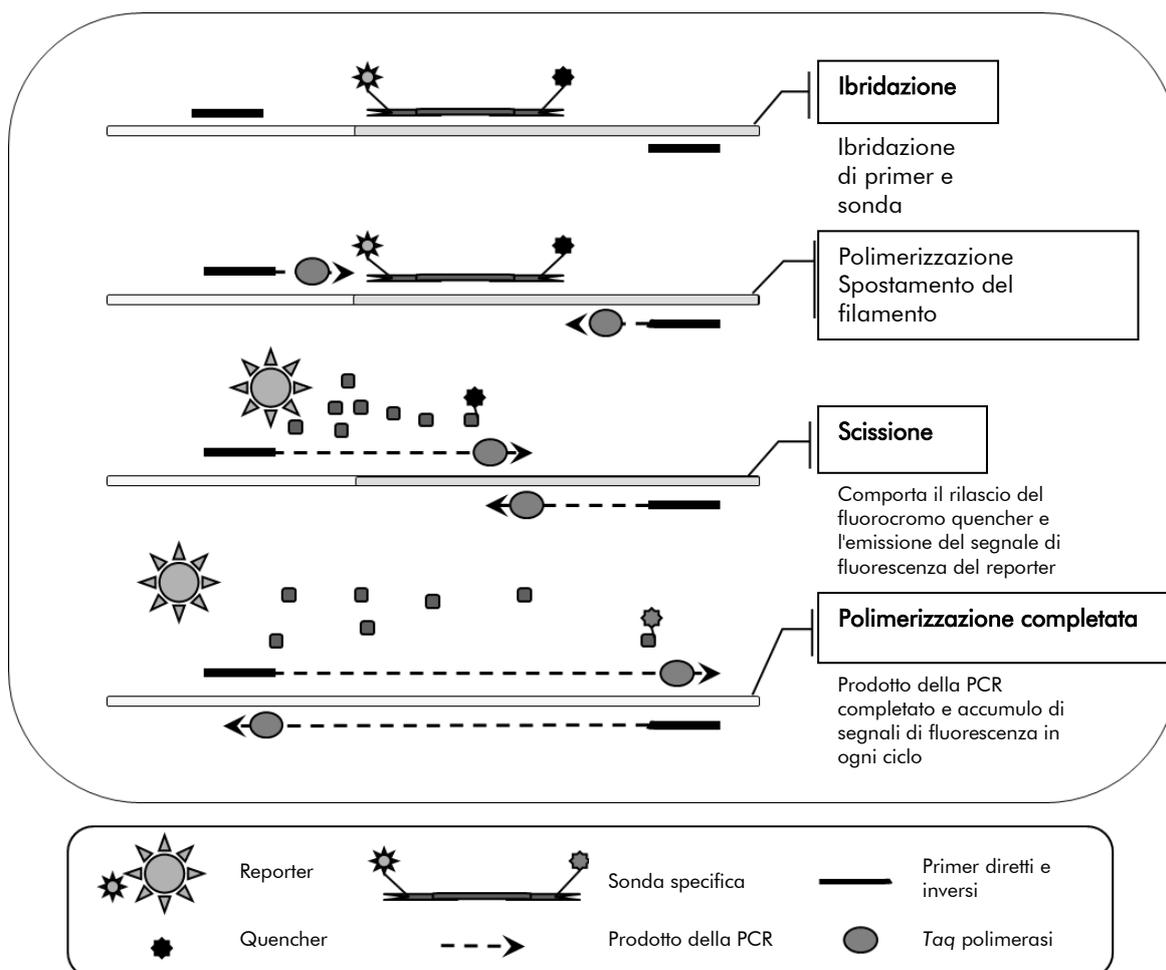
La qPCR consente l'accurata quantificazione dei prodotti della PCR durante la fase esponenziale del processo di amplificazione della PCR. I dati della PCR quantitativa possono essere ottenuti rapidamente, senza ricorrere a trattamento post-PCR, rilevando in tempo reale i segnali di fluorescenza durante 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 esonucleasica 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 3). 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 è rilevata. Pertanto l'aumento della fluorescenza è direttamente proporzionale all'amplificazione del bersaglio durante la PCR.



**Figure 3. 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

<b>ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Catalogo n°</b>		<b>670723</b>
<b>Numero di reazioni</b>		<b>24</b>
High Positive RNA Control (controllo RNA altamente positivo)		3 x 10 µl
IS-MMR Calibrator (calibratore IS-MMR)		3 x 10 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (diluizione standard di plasmidi singoli Mbcr e ABL) (10 <sup>1</sup> copie/5 µl)	SP1-BCR-ABL Mbcr & ABL	35 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (diluizione standard di plasmidi singoli Mbcr e ABL) (10 <sup>2</sup> copie/5 µl)	SP2-BCR-ABL Mbcr & ABL	35 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (diluizione standard di plasmidi singoli Mbcr e ABL) (10 <sup>3</sup> copie/5 µl)	SP3-BCR-ABL Mbcr & ABL	70 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (diluizione standard di plasmidi singoli Mbcr e ABL) (10 <sup>4</sup> copie/5 µl)	SP4-BCR-ABL Mbcr & ABL	35 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (diluizione standard di plasmidi singoli Mbcr e ABL) (10 <sup>5</sup> copie/5 µl)	SP5-BCR-ABL Mbcr & ABL	70 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (diluizione standard di plasmidi singoli Mbcr e ABL) (10 <sup>6</sup> copie/5 µl)	SP6-BCR-ABL Mbcr & ABL	70 µl
Primers and Probe Mix ABL* (miscela di primer e sonda ABL)	PPC-ABL 25x	110 µl

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

<b>ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit</b>	<b>(24)</b>
<b>Catalogo n°</b>	<b>670723</b>
<b>Numero di reazioni</b>	<b>24</b>
Primers and Probe Mix BCR-ABL MbcR Fusion PPF-MbcR 25x Gene <sup>†</sup> (miscela di primer e sonda gene di fusione BCR-ABL MbcR)	110 µl
ipsogen <i>BCR-ABL1 mbcR IS-MMR Kit Handbook</i> (inglese)	1

<sup>†</sup> Miscela di primer inversi e diretti specifici per il gene di fusione BCR-ABL MbcR più una sonda FAM–TAMRA specifica.

**Nota:** Miscelare delicatamente e centrifugare brevemente gli standard (SP1–SP6) e le miscele di primer e sonda prima dell'uso.

## 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

- Reagenti per la purificazione dell'RNA: i reagenti validati sono RNeasy<sup>®</sup> Midi Kit (QIAGEN, n. cat. 75144) o il reagente TRIzol<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific Inc, n. cat. 15596018 o 15596026)
- Acqua priva di nucleasi di grado PCR
- Tampone e Taq DNA polimerasi: i reagenti validati sono la DNA polimerasi *Premix Ex Taq*<sup>™</sup> (Perfect Real Time) (TaKaRa, n. cat. RR039A) e la DNA polimerasi *Premix Ex Taq* (Probe qPCR) (TaKaRa, n. cat. RR390A). Entrambi includono la soluzione master mix 2x Taq DNA polimerasi e i fluorocromi di riferimento ROX<sup>™</sup>
- Reagenti per la trascrizione inversa: i reagenti validati sono *ipsogen* RT Kit, che include trascrittasi inversa, 5x tampone RT, 100 mM di DTT, inibitore RNasi, primer random e dNTP (QIAGEN, n. cat. 679923); oppure SuperScript<sup>®</sup> III Reverse Transcriptase, che include trascrittasi inversa, 5x tampone di primo filamento e 100 mM di DTT (Thermo Fisher Scientific Inc., n. cat. 18080044)
- Se si utilizza SuperScript III, occorre procurarsi anche i reagenti seguenti:
  - Inibitore RNasi: il reagente validato è RNaseOUT<sup>™</sup> Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Thermo Fisher Scientific Inc., n. cat. 10777019)
  - Set di dNTP, grado PCR

- Nonamero Random

### 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

- Pipette con graduazione in microlitri\* specifiche per PCR (1–10  $\mu$ l; 10–100  $\mu$ l; 100–1000  $\mu$ 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)
- Strumentazione per PCR in tempo reale:\* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o altro strumento Rotor-Gene; LightCycler 1.2, 1.5, 2.0 o 480; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; ABI PRISM 7900HT SDS; e materiale specifico associato
- Termociclatore\* o bagnomaria\* (fase di 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](http://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 gli standard (SP1–SP6) in una stanza separata.

## 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.

## Conservazione e manipolazione dei campioni

I campioni di sangue intero devono essere trattati con anticoagulante EDTA di potassio e conservati a 2–8°C per non oltre 5 giorni dall'estrazione dell'RNA.

## 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 in larga misura dalla qualità dell'RNA immesso. Si consiglia, pertanto, di qualificare l'RNA purificato mediante elettroforesi su gel di agarosio\*, utilizzando Agilent® Bioanalyzer®, o mediante spettrofotometria prima di eseguire l'analisi.†

### Protocollo: Trascrittasi inversa utilizzando SuperScript III Reverse Transcriptase

Questo protocollo descrive la trascrittasi inversa utilizzando SuperScript III Reverse Transcriptase. Se si utilizza il kit *ipsogen RT*, seguire il protocollo nel *Manuale del kit ipsogen RT*.

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

† Assorbanza (OD) misurata a 260 e 280 nm: un valore OD di 1,0 a 260 nm equivale a circa 40 µg/ml di RNA a singolo filamento. Un rapporto  $A_{260}/A_{280}$  compreso fra 1,8 e 2,1 è indicativo di RNA altamente purificato.

## **Cosa fare prima di iniziare**

- Preparare i dNTP, 10 mM ciascuno. Conservare in aliquote a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **Procedura**

- 1. Scongellare tutti i componenti necessari e collocarli su ghiaccio.**
- 2. Miscelare accuratamente (non agitare su vortex) e centrifugare brevemente (circa 10 s a 10.000 giri/min, per raccogliere il liquido sul fondo della provetta), poi conservare su ghiaccio.**
- 3. Adattare i campioni di RNA a  $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Pipettare  $10 \mu\text{l}$  ( $1 \mu\text{g}$ ) di ciascun campione di RNA in provette separate etichettate. Pipettare  $10 \mu\text{l}$  del controllo RNA altamente positivo,  $10 \mu\text{l}$  del calibratore IS-MMR e  $10 \mu\text{l}$  di acqua priva di nucleasi (come controllo RT negativo) in provette separate etichettate, e analizzarli in parallelo con i campioni di RNA, come di seguito descritto.**
- 4. Incubare ogni campione, controllo e calibratore ( $10 \mu\text{l}$  ciascuno) per 5 min a  $65^{\circ}\text{C}$  e raffreddare immediatamente su ghiaccio per 5 min.**
- 5. Centrifugare brevemente (circa 10 s a 10.000 giri/min, per raccogliere il liquido sul fondo della provetta), poi conservare su ghiaccio.**
- 6. Preparare la seguente miscela RT a seconda del numero di campioni, controllo e calibratore da analizzare (Tabella 1).**

**Tabella 1. Preparazione della miscela RT**

<b>Componente</b>	<b>Volume per campione (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentrazione finale</b>
Tampone "first-strand", 5x (fornito con SuperScript II Reverse Transcriptase)	5,0	1x
dNTP (10 mM ciascuno, da preparare precedentemente e conservare in aliquote a $-20^{\circ}\text{C}$ )	2,0	0,8 mM
Nonamero qualsiasi (100 $\mu\text{M}$ )	5,25	21 $\mu\text{M}$
RNaseOUT (40 U/ $\mu$ l)	0,5	0,8 U/ $\mu$ l
SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ l)	1,0	8 U/ $\mu$ l
DTT (fornito con SuperScript III Reverse Transcriptase)	1,25	–
Campione di RNA riscaldato, controllo o calibratore IS-MMR (da aggiungere nella fase 7)	10,0	40 ng/ $\mu$ l
Volume finale	25,0	–

- 7. Pipettare 15  $\mu\text{L}$  della miscela RT in ogni provetta per PCR. Aggiungere poi 10  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}$ ) di RNA campione, controllo o calibratore (dalla fase 4).**
- 8. Miscelare accuratamente (non agitare su vortex) e centrifugare brevemente (circa 10 s a 10.000 giri/min, per raccogliere il liquido sul fondo della provetta).**
- 9. Programmare il termociclatore con il programma di trascrittasi inversa indicato nella Tabella 2.**

**Tabella 2. Profilo termico**

<b>Trascrittasi inversa 1</b>	Temperatura: 25°C Durata: 10 min
<b>Trascrittasi inversa 2</b>	Temperatura: 50°C Durata: 60 min
<b>Inattivazione</b>	Temperatura: 85°C Durata: 5 min
<b>Raffreddamento</b>	Temperatura: 4°C Durata: 5 min

- 10. Collocare le provette nel termociclatore e avviare il programma di ciclizzazione termica indicato nella Tabella 2.**
- 11. Al termine del programma, centrifugare brevemente le provette (circa 10 s, 10.000 giri/min, per raccogliere il liquido sul fondo della provetta). Conservare le provette su ghiaccio o a -20°C finché la qPCR non è stata eseguita secondo i protocolli di seguito descritti con la rispettiva strumentazione per qPCR.**

**Nota:** Per gli strumenti LightCycler 1.2, 1.5 e 2.0, ogni preparazione RT contiene cDNA per due analisi di 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 questo strumento, si consiglia di effettuare tutte le misurazioni in duplicato, come indicato nella Tabella 3. Il kit è concepito per analizzare nello stesso esperimento 8 diversi campioni di cDNA 3 volte.

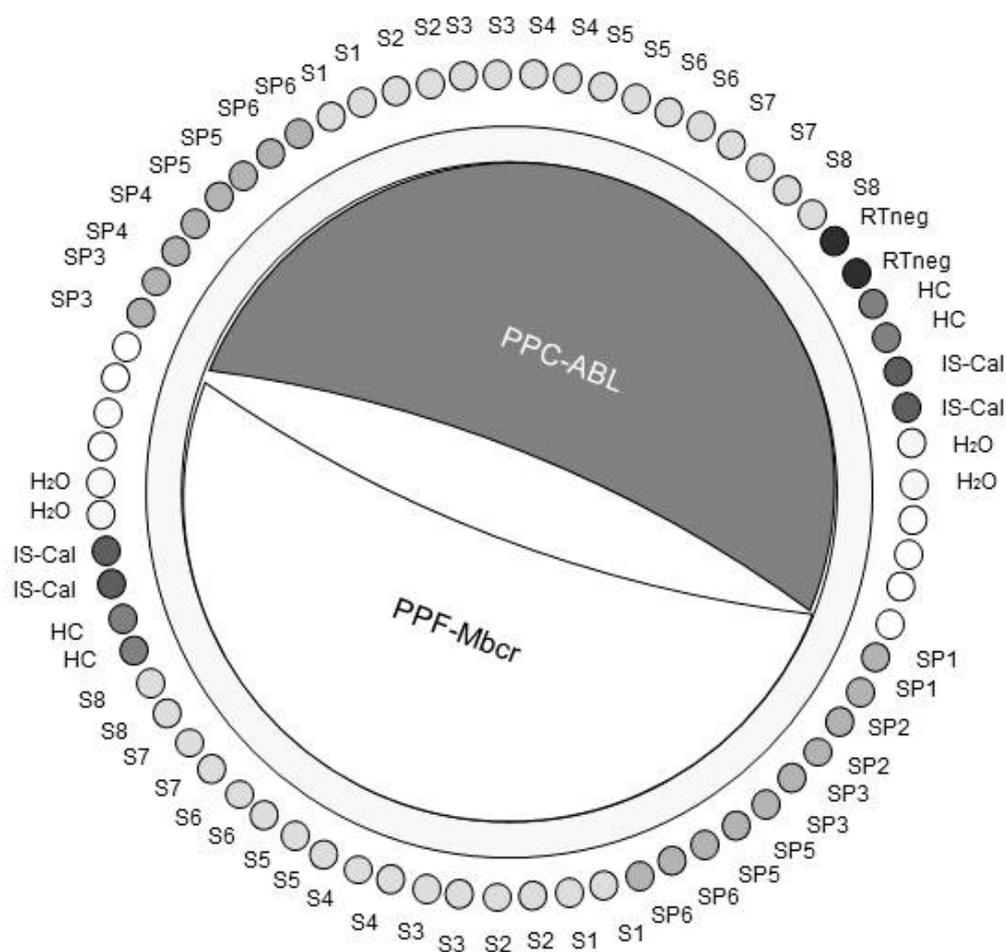
**Tabella 3. Numero di reazioni per strumenti Rotor-Gene Q con rotore a 72 provette**

Campioni	Reazioni
<b>Con la miscela di primer ABL e sonda (PPC-ABL) (32 reazioni)</b>	
8 campioni di cDNA	8 x 2 reazioni
1 controllo cDNA altamente positivo	2 reazioni
1 calibratore cDNA IS-MMR	2 reazioni
Standard plasmidici singoli	2 x 4 reazioni (SP3, SP4, SP5 e SP6, ciascuno testato in duplicato)
Controllo RT negativo	2 reazioni
Acqua come materiale di controllo	2 reazioni
<b>Con la miscela di primer BCR-ABL Mbc e sonda (PPF-Mbc) (32 reazioni)</b>	
8 campioni di cDNA	8 x 2 reazioni
1 controllo cDNA altamente positivo	2 reazioni
1 calibratore cDNA IS-MMR	2 reazioni
Standard plasmidici singoli	2 x 5 reazioni (SP1, SP2, SP3, SP5 e SP6, ciascuno testato 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. La configurazione del rotore in Figura 4 mostra un esempio dell'esperimento.



**Figura 4. Configurazione consigliata del rotore per ogni esperimento con il kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR. SP1–SP6:** standard BCR-ABL Mbcr e ABL; **HC:** controllo cDNA altamente positivo; **IS-Cal:** calibratore IS-MMR; **RTneg:** controllo RT negativo; **S:** campione di cDNA; **H<sub>2</sub>O:** 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. Scongellare tutti i componenti necessari e collocarli su ghiaccio.**

2. **Agitare su vortex gli standard, le provette PPF-Mbcr e PPC-ABL e centrifugare brevemente (circa 10 s, 10.000 giri/min, per raccogliere il liquido sul fondo della provetta).**
3. **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  $\mu$ 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**

<b>Componente</b>	<b>1 reazione (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 32+1 reazioni (<math>\mu</math>l)</b>	<b>BCR-ABL Mbcr: 32+1 reazioni (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentrazione finale</b>
Premix Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Miscela di primer e sonda, 25x	1	33	33	1x
Acqua per PCR priva di nucleasi	6,5	214,5	214,5	–
Campione (da aggiungere alla fase 5)	5	5 ciascuno	5 ciascuno	–
Volume totale	25	25 ciascuno	25 ciascuno	–

4. **Dispensare 20  $\mu$ l della premiscela qPCR in ogni provetta.**
5. **In una diversa area di laboratorio e utilizzando attrezzatura dedicata, aggiungere 5  $\mu$ l del prodotto RT (cDNA, equivalente a 200 ng di RNA) ottenuto nella trascrittasi inversa (vedere "Protocollo: Trascrittasi inversa utilizzando SuperScript III Reverse Transcriptase", pag. 14) nella provetta corrispondente (volume totale 25  $\mu$ l).**
6. **Miscelare delicatamente aspirando e rilasciando con una pipetta.**

7. **Chiudere tutte le provette e collocarle nel termociclatore secondo le istruzioni del produttore.**
8. **Programmare lo strumento Rotor-Gene Q con il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 5.**

**Tabella 5. Profilo termico**

<b>Modalità di analisi</b>	<b>Quantificazione</b>
<b>Mantenimento 1</b>	Temperatura: 95°C Durata: 10 s
<b>Ciclizzazione</b>	50 volte 95°C per 5 s 60°C per 30 s con acquisizione della fluorescenza FAM nel canale Green: singolo
<b>Mantenimento 2</b>	Temperatura: 36°C Durata: 1 min

9. **Fare clic su "Gain Optimisation" (Ottimizzazione guadagno) nella finestra di dialogo "New Run Wizard" (Creazione guidata nuova seduta) per aprire la finestra di dialogo "Auto-Gain Optimisation Setup" (Impostazione automatica ottimizzazione guadagno). Impostare l'intervallo per il canale verde tra "5 FI" per "Min Reading" (Lettura minima) e "10 FI" per "Max Reading" (Lettura massima) e l'intervallo consentito per "Gain" (Guadagno) tra -10 e 10.**
10. **Selezionare la casella "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Esegui ottimizzazione prima della 1a acquisizione), quindi chiudere la finestra di dialogo "Auto-Gain Optimisation Setup" (Impostazione automatica ottimizzazione guadagno).**
11. **Avviare il programma di ciclaggio termico.**
12. **Selezionare "Slope Correct" (Correzione slope) per l'analisi. Consigliamo impostare il valore soglia su 0,03.**

## Protocollo: qPCR su Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System e strumenti ABI PRISM 7900HT SDS e LightCycler 480

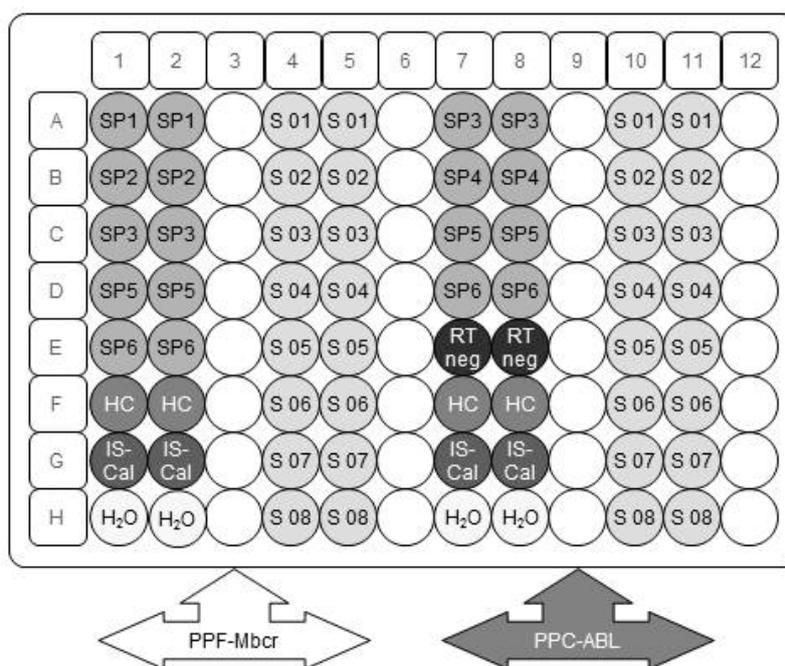
Se si utilizza un dispositivo per qPCR a 96 pozzetti, si consiglia di effettuare tutte le misurazioni in duplicato, come indicato nella Tabella 6. Il kit è concepito per analizzare nello stesso esperimento 8 diversi campioni di cDNA 3 volte.

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

<b>Campioni</b>	<b>Reazioni</b>
<b>Con la miscela di primer ABL e sonda (PPC-ABL) (32 reazioni)</b>	
8 campioni di cDNA	8 x 2 reazioni
1 controllo cDNA altamente positivo	2 reazioni
1 calibratore cDNA IS-MMR	2 reazioni
Standard plasmidici singoli	2 x 4 reazioni (SP3, SP4, SP5 e SP6, ciascuno testato in duplicato)
Controllo RT negativo	2 reazioni
Acqua come materiale di controllo	2 reazioni
<b>Con la miscela di primer BCR-ABL Mbcr e sonda (PPF-Mbcr) (32 reazioni)</b>	
8 campioni di cDNA	8 x 2 reazioni
1 controllo cDNA altamente positivo	2 reazioni
1 calibratore cDNA IS-MMR	2 reazioni
Standard plasmidici singoli	2 x 5 reazioni (SP1, SP2, SP3, SP5 e SP6, ciascuno testato in duplicato)
Acqua come materiale di controllo	2 reazioni

## Processazione dei campioni su strumenti Applied Biosystems, ABI PRISM 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 5 mostra un esempio dell'esperimento.



**Figura 5. Configurazione consigliata della piastra per un esperimento con il kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR.** SP1–SP6: standard BCR-ABL Mbcr e ABL; HC: controllo cDNA altamente positivo; IS-Cal: calibratore IS-MMR; RTneg: controllo RT negativo; S: campione di cDNA; H<sub>2</sub>O: acqua come materiale di controllo.

## qPCR su strumenti Applied Biosystems, ABI PRISM o LightCycler 480

**Nota:** Eseguire tutte le fasi su ghiaccio.

### Procedura

1. Scongelare tutti i componenti necessari e collocarli su ghiaccio.
2. Agitare su vortex gli standard, le provette ROX, PPF-Mbcr e PPC-ABL e centrifugare brevemente (circa 10 s, 10.000 giri/min, per raccogliere il liquido sul fondo della provetta).
3. 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 per gli strumenti Applied Biosystems e ABI PRISM, calcolata per ottenere un volume di reazione finale di 25  $\mu$ l. La tabella 8 mostra lo schema di pipettatura per la preparazione di una miscela di reagenti per lo strumento LightCycler 480, calcolata per ottenere un volume di reazione finale di 25  $\mu$ 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 per gli strumenti Applied Biosystems e ABI PRISM**

<b>Componente</b>	<b>1 reazione (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 32+1 reazioni (<math>\mu</math>l)</b>	<b>BCR-ABL Mbcr: 32+1 reazioni (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentrazione finale</b>
Premix Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Miscela di primer e sonda, 25x	1	33	33	1x
Fluorocromo ROX I, 50x (ABI PRISM 7900HT) o fluorocromo ROX II, 50x (Applied Biosystems 7500)	0,5	16,5	16,5	1x
Acqua per PCR priva di nucleasi	6	198	198	–
Campione (da aggiungere alla fase 5)	5	5 ciascuno	5 ciascuno	–
Volume totale	25	25 ciascuno	25 ciascuno	–

**Tabella 8. Preparazione della miscela qPCR per LightCycler 480**

<b>Componente</b>	<b>1 reazione (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 32+1 reazioni (<math>\mu</math>l)</b>	<b>BCR-ABL Mbc: 32+1 reazioni (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentrazione finale</b>
Premix Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Miscela di primer e sonda, 25x	1	33	33	1x
Acqua per PCR priva di nucleasi	6,5	214,5	214,5	–
Campione (da aggiungere alla fase 5)	5	5 ciascuno	5 ciascuno	–
Volume totale	25	25 ciascuno	25 ciascuno	–

4. **Dispensare 20  $\mu$ l della premiscela qPCR in ogni pozzetto.**
5. **In una diversa area di laboratorio e utilizzando attrezzatura dedicata, aggiungere 5  $\mu$ l del prodotto RT (cDNA, equivalente a 200 ng di RNA) ottenuto nella trascrittasi inversa (vedere "Protocollo: Trascrittasi inversa utilizzando SuperScript III Reverse Transcriptase", pag. 14) nel pozzetto corrispondente (volume totale 25  $\mu$ l).**
6. **Miscelare delicatamente aspirando e rilasciando con una pipetta.**
7. **Chiudere la piastra e centrifugare brevemente (300 x g, circa 10 s).**
8. **Posizionare la piastra nel termociclatore secondo le istruzioni del produttore. Programmare il termociclatore con il programma di ciclizzazione termica, come indicato nella Tabella 9 per gli strumenti Applied Biosystems e ABI PRISM, o come indicato nella Tabella 10 per lo strumento LightCycler 480.**

**Tabella 9. Profilo termico per gli strumenti Applied Biosystems e ABI PRISM**

<b>Modalità di analisi</b>	Curva standard — Quantificazione assoluta
<b>Mantenimento 1</b>	Temperatura: 95°C Durata: 10 s
<b>Ciclizzazione</b>	50 volte 95°C per 5 s 60°C per 30 s; con acquisizione della fluorescenza FAM: singolo; quencher: TAMRA
<b>Mantenimento 2</b>	Temperatura: 36°C Durata: 1 min

**Tabella 10. Profilo termico per lo strumento LightCycler 480**

<b>Modalità di analisi</b>	Quantificazione assoluta ("Abs Quant")
<b>Formati di rilevazione</b>	Selezionare "Simple Probe" (sonda semplice) nella finestra dei formati di rilevazione
<b>Mantenimento 1</b>	Temperatura: 95°C Durata: 10 s
<b>Ciclizzazione</b>	50 volte 95°C per 5 s 60°C per 30 secondi con acquisizione della fluorescenza FAM corrispondente a (483–533 nm) per la versione LC 01 e (465–510 nm) per la versione LC 02
<b>Mantenimento 2</b>	Temperatura: 36°C Durata: 1 min

- 9. Per Applied Biosystems 7500 e ABI PRISM 7900HT SDS, seguire la fase 9a. Per lo strumento LightCycler 480, seguire la fase 9b.**
- 9a. Strumenti Applied Biosystems e ABI PRISM: si consiglia di impostare la soglia a 0,1 durante la fase di analisi sullo strumento. Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 9.**
- 9b. Strumento LightCycler 480: si consiglia una modalità di analisi Fit point con segnale di fondo a 2,0 e soglia a 2,0. Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 10.**

## Protocollo: qPCR su strumenti LightCycler 1.2, 1.5 e 2.0

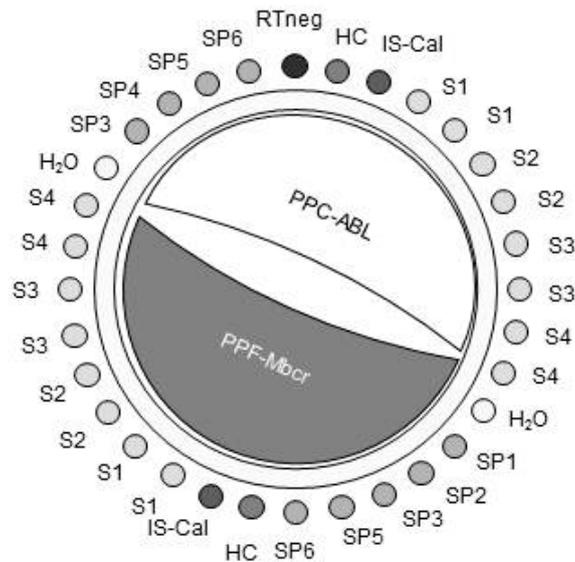
Se si utilizzano strumenti a capillari, si consiglia di analizzare i campioni in duplicato e i controlli una sola volta, come indicato nella Tabella 11. Il kit è concepito per analizzare nello stesso esperimento 4 diversi campioni di cDNA 6 volte.

**Tabella 11. Numero di reazioni per gli strumenti LightCycler 1.2, 1.5 e 2.0**

<b>Campioni</b>	<b>Reazioni</b>
<b>Con la miscela di primer ABL e sonda (PPC-ABL) (16 reazioni)</b>	
4 campioni di cDNA	4 x 2 reazioni
1 controllo cDNA altamente positivo	1 reazione
1 calibratore cDNA IS-MMR	1 reazione
Standard plasmidici singoli	1 x 4 reazioni (SP3, SP4, SP5 e SP6)
Controllo RT negativo	1 reazione
Acqua come materiale di controllo	1 reazione
<b>Con la miscela di primer BCR-ABL Mbc e sonda (PPF-Mbc) (16 reazioni)</b>	
4 campioni di cDNA	4 x 2 reazioni
1 controllo cDNA altamente positivo	1 reazione
1 calibratore cDNA IS-MMR	1 reazione
Standard plasmidici singoli	1 x 5 reazioni (SP1, SP2, SP3, SP5 e SP6)
Acqua come materiale di controllo	1 reazione

## Processazione dei campioni su strumenti LightCycler 1.2, 1.5 e 2.0

Si consiglia di effettuare il test con almeno 4 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 6 mostra un esempio dell'esperimento.



**Figura 6. Configurazione consigliata del rotore per ogni esperimento con il kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR. SP1–SP6:** standard BCR-ABL Mbc e ABL; **HC:** controllo cDNA altamente positivo; **IS-Cal:** calibratore IS-MMR; **RTneg:** controllo RT negativo; **S:** campione di cDNA; **H<sub>2</sub>O:** acqua come materiale di controllo.

## qPCR su strumenti LightCycler 1.2, 1.5 e 2.0

**Nota:** Eseguire tutte le fasi su ghiaccio.

### Procedura

1. **Scongelare tutti i componenti necessari e collocarli su ghiaccio.**
2. **Agitare su vortex gli standard, le provette PPF-Mbcr e PPC-ABL e centrifugare brevemente (circa 10 s, 10.000 giri/min, per raccogliere il liquido sul fondo della provetta).**
3. **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 12 mostra lo schema di pipettatura per la preparazione di una miscela di reagenti, calcolata per ottenere un volume di reazione finale di 20  $\mu$ 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 12. Preparazione della miscela qPCR per gli strumenti LightCycler 1.2, 1.5 e 2.0**

<b>Componente</b>	<b>1 reazione (μl)</b>	<b>ABL: 16+1 reazioni (μl)</b>	<b>BCR-ABL Mbc: 16+1 reazioni (μl)</b>	<b>Concentrazione finale</b>
Premix Ex Taq, 2x	10	170	170	1x
Miscela di primer e sonda, 25x	0,8	13,6	13,6	1x
Acqua per PCR priva di nucleasi	4,2	71,4	71,4	–
Campione (da aggiungere alla fase 5)	5	5 ciascuno	5 ciascuno	–
Volume totale	20	20 ciascuno	20 ciascuno	–

4. **Dispensare 15 μl della premiscela qPCR in ogni capillare.**
5. **In una diversa area di laboratorio e utilizzando attrezzatura dedicata, aggiungere 5 μl del prodotto RT (cDNA, equivalente a 200 ng di RNA) ottenuto nella trascrittasi inversa (vedere "Protocollo: Trascrittasi inversa utilizzando SuperScript III Reverse Transcriptase", pag. 14) nel capillare corrispondente (volume totale 20 μl).**
6. **Miscelare delicatamente aspirando e rilasciando con una pipetta.**
7. **Posizionare i capillari negli adattatori forniti assieme all'apparecchiatura e centrifugare brevemente (700 x g, circa 10 s).**
8. **Caricare i capillari nel termociclatore secondo le istruzioni del produttore.**
9. **Programmare lo strumento LightCycler 1.2, 1.5, o 2.0 con il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 13.**

**Tabella 13. Profilo termico**

<b>Modalità di analisi</b>	<b>Quantificazione</b>
<b>Mantenimento 1</b>	Temperatura: 95°C Durata: 10 s Rampa: 20
<b>Ciclizzazione</b>	50 volte 95°C per 5 s; rampa: 20 60°C per 30 s; rampa: 20; con acquisizione della fluorescenza FAM: singolo
<b>Mantenimento 2</b>	Temperatura: 36°C Durata: 1 min Rampa: 20

**10. Per lo strumento LightCycler 1.2 e 1.5, seguire la fase 10a. Per lo strumento LightCycler 2.0, seguire la fase 10b.**

**10a. LightCycler 1.2 e 1.5: si consiglia di utilizzare la modalità F1/F2 e "2<sup>nd</sup> derivative analysis" (analisi della derivata seconda). Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 13.**

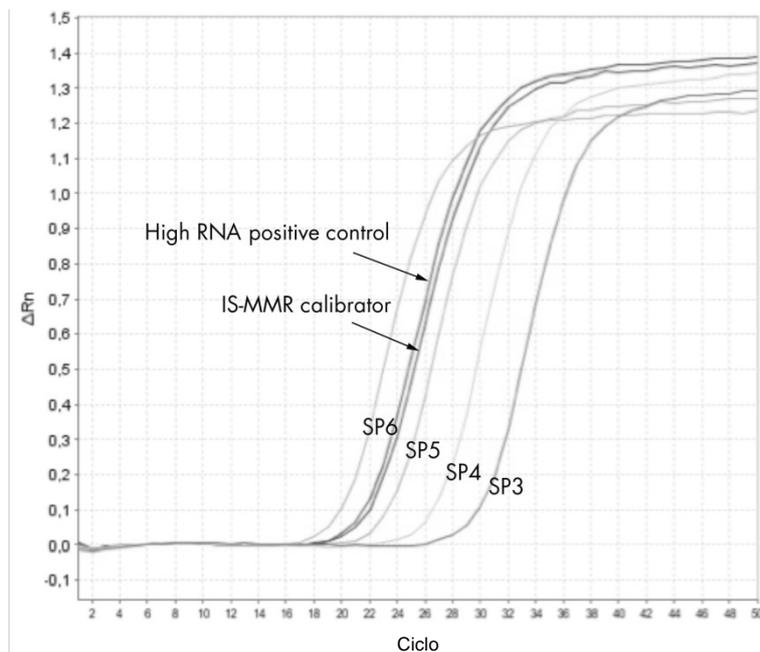
**10b. LightCycler 2.0: si consiglia di utilizzare l'analisi automatica (F''max) sul LightCycler 2.0 con versione software 4.0 per ottenere risultati riproducibili. Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 13.**

# Interpretazione dei risultati

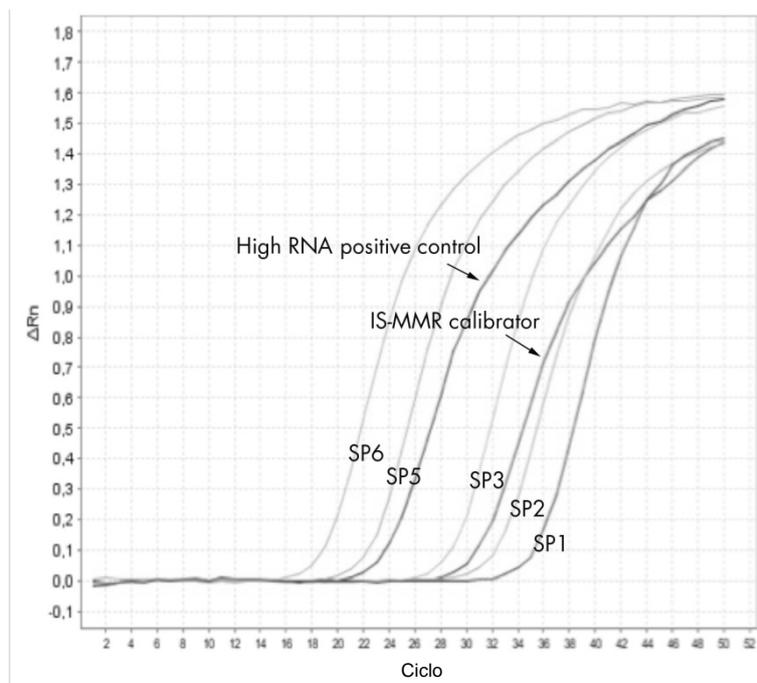
## Principio di analisi dei dati

Nella tecnologia TaqMan<sup>®</sup>, 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 *ipsogen* si basano su plasmidi. Per ottenere curve standard accurate si utilizzano 4 diluizioni standard per ABL e 5 diluizioni standard per Mbc. Il kit include inoltre un calibratore IS-MMR che consente di convertire i risultati sulla scala internazionale. Le Figure 7 e 8 mostrano esempi delle curve di amplificazione TaqMan ottenute per gli standard, il calibratore IS-MMR e il controllo RNA altamente positivo con il kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR.



**Figura 7. Rilevazione di ABL con gli standard SP3, SP4, SP5 e SP6.  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  copie/ $5 \mu\text{l}$ .**



**Figura 8. Rilevazione di BCR-ABL Mbc con gli standard SP1, SP2, SP3, SP5 e SP6.**  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  copie/ $5 \mu\text{l}$ .

## Curve standard e criteri di qualità applicabili ai dati non elaborati

### 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.

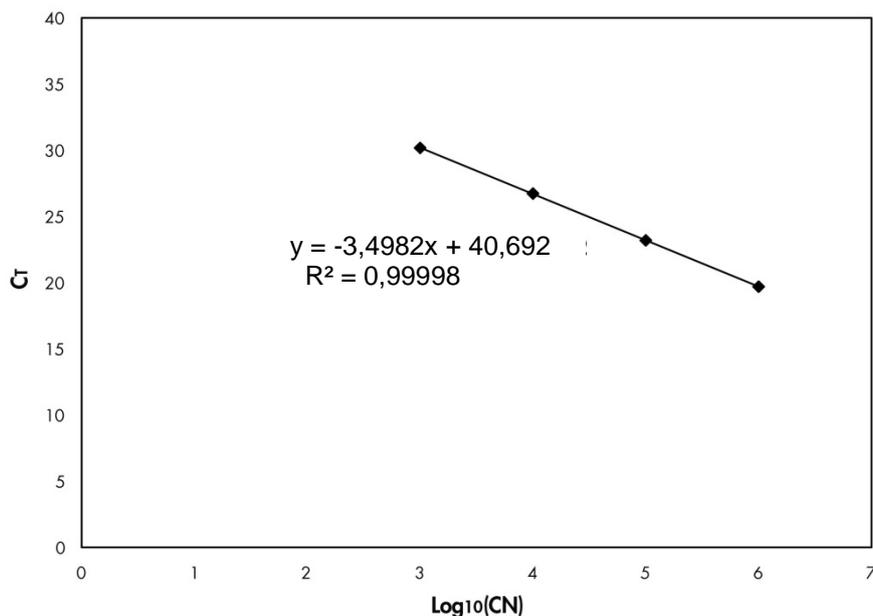
La variazione dei valori  $C_T$  tra i replicati è generalmente  $<1,5$  se il valore  $C_T$  medio dei replicati è  $<36$  (7).

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

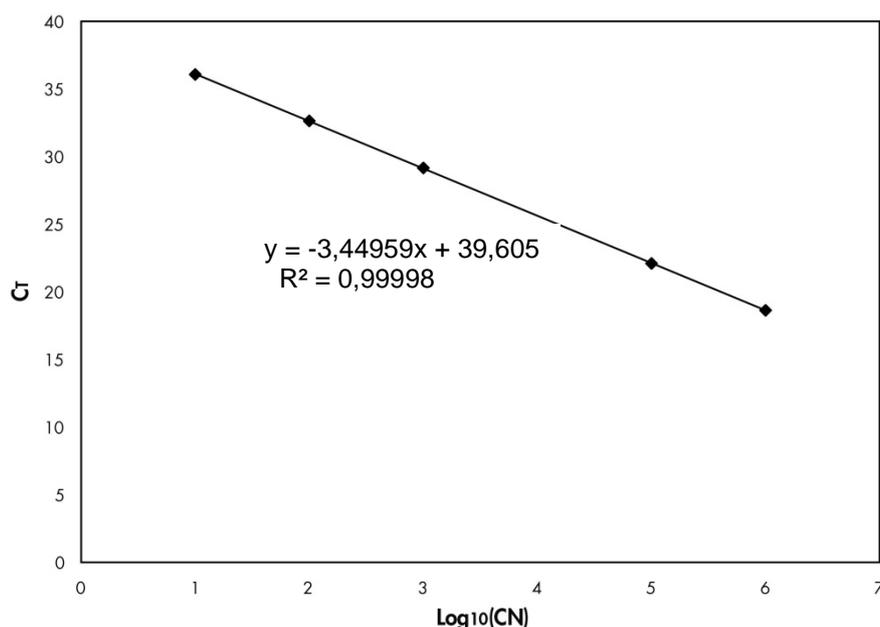
### Curve standard

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, 5 e 6 per SP3, SP4, SP5 e SP6; 1, 2, 3, 5 e 6 per SP1, SP2, SP3, SP5 e SP6). La Figura 9 mostra un esempio della curva teorica degli standard per ABL calcolata con 4 diluizioni standard. La Figura 10 mostra un esempio della curva teorica degli standard per BCR-ABL calcolata con 5 diluizioni standard.



**Figura 9. Curva teorica degli standard per ABL calcolata con 4 diluizioni standard.** Si calcola una curva di regressione lineare ( $y = ax + b$ ), 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.



**Figura 10. Curva teorica degli standard per BCR-ABL calcolata con 5 diluizioni standard.** Si calcola una curva di regressione lineare ( $y = ax + b$ ), 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 fra  $-3,0$  e  $-3,9$  è accettabile, posto che  $R^2$  sia  $>0,95$  (7). Tuttavia, per ottenere risultati precisi è auspicabile un valore di  $R^2 >0,98$  (3).

**Nota:** La diluizione standard SP1 (plasmide BCR-ABL, 10 copie) deve essere rilevata e inclusa nella curva standard BCR-ABL.

### **Controllo qualità su tutti i valori ABL**

Una scarsa qualità dell'RNA o problemi intervenuti durante le fasi di qPCR producono ridotti numeri di copie ABL ( $ABL_{CN}$ ). Un livello ottimale di sensibilità si ottiene da campioni contenenti  $ABL_{CN} \geq 10.000$ . Questo criterio relativo a  $ABL_{CN}$  si applica anche al controllo RNA altamente positivo e al calibratore IS-MMR.

### **Controllo RT negativo e acqua come materiale di controllo**

I controlli no template (NTC) per la fase PCR (acqua come materiale di controllo) e la fase di trascrittasi inversa (controllo RT negativo) devono dare un valore CN pari a zero sia per ABL che BCR-ABL Mbc. Un risultato positivo per questo NTC indica che si è verificata una contaminazione crociata durante la trascrittasi inversa e/o la qPCR.

### **Numero di copie normalizzato (NCN)**

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

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

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

Calcolare il risultato NCN per il controllo RNA altamente positivo ( $NCN_{HC}$ ), il calibratore IS-MMR ( $NCN_{cal}$ ) e ciascun campione ( $NCN_{campione}$ ).

### **Controllo RNA altamente positivo e calibratore IS-MMR**

Questi controlli permettono di monitorare la trascrittasi inversa e le fasi di amplificazione di ABL e BCR-ABL Mbc durante la quantificazione dei trascritti.

### **Controllo qualità sul risultato $NCN_{cal}$**

**Nota:** Il risultato NCN ottenuto per il calibratore IS-MMR, testato con il kit *ipsogen* BCR-ABL Mbc IS-MMR in combinazione con i reagenti e gli strumenti convalidati (vedere "Materiali in dotazione", pag. 10, e "Materiali necessari ma non in dotazione", pag. 11), deve essere compreso nell'intervallo 0,05–0,3. In caso contrario, i valori NCN non possono essere convertiti sulla scala

internazionale. Inoltre, l'intero esperimento non deve essere considerato valido se non viene rilevato il controllo RNA altamente positivo.

## Conversione sulla scala IS e determinazione della MMR (risposta molecolare maggiore)

**Nota:** Prima di interpretare i risultati, fare riferimento al valore indicato sull'etichetta della provetta del calibratore IS-MMR oppure sul certificato di analisi allegato al kit.

Utilizzare il risultato NCN sperimentale del calibratore IS-MMR ( $NCN_{cal}$ ) e il relativo valore assegnato (valore IS-Cal) indicato sul certificato di analisi per calcolare il numero di copie normalizzato sulla scala internazionale (IS- $NCN_{campione}$ ).

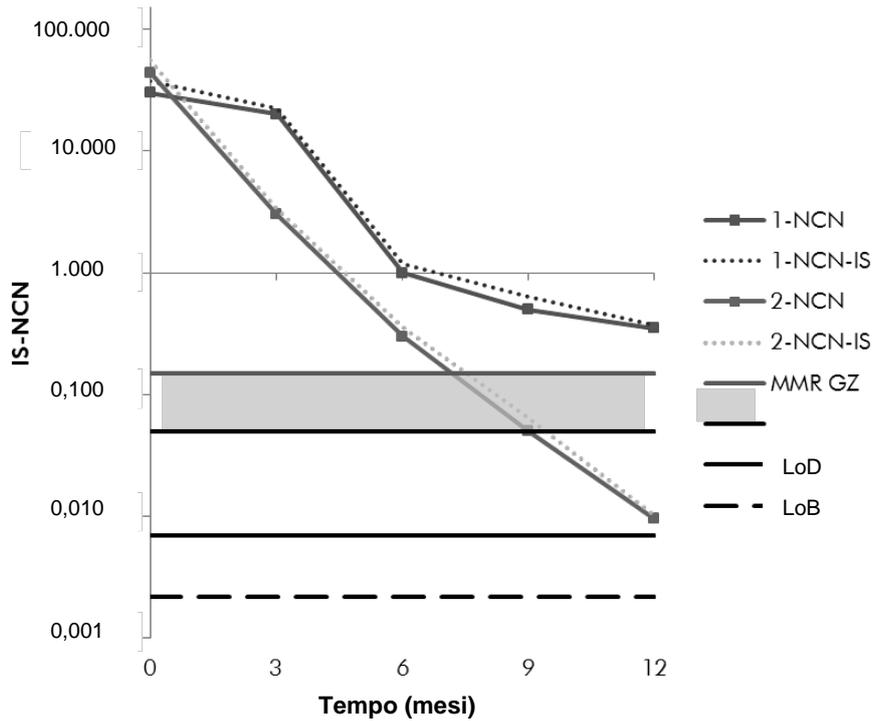
$$IS-NCN_{campione} = \frac{NCN_{campione} \times \text{valore IS-Cal}}{NCN_{cal}}$$

Determinare lo stato MMR di ciascun campione secondo i seguenti criteri:

- **IS- $NCN_{campione} \leq 0,05$ :** risposta molecolare maggiore
- **$0,05 < IS-NCN_{campione} < 0,15$ :** zona grigia intorno al cutoff MMR, risultato non conclusivo
- **IS- $NCN_{campione} \geq 0,15$ :** assenza di risposta molecolare maggiore

Il risultato IS- $NCN_{HC}$  (NCN sulla scala internazionale per il controllo RNA altamente positivo) dovrebbe indicare l'assenza di risposta molecolare maggiore.

La Figura 11 mostra un esempio di monitoraggio del paziente utilizzando i risultati NCN e IS-NCN.



**Figura 11. Curve di monitoraggio relative allo stato MMR del paziente con il kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR. NCN: numero di copie normalizzato; NCN-IS: numero di copie normalizzato sulla scala internazionale; MMR GZ: zona grigia MMR (GZ), risultato non conclusivo; LoD: limite di rilevabilità; LoB: limite del bianco.**

## Riepilogo dei criteri di qualità

La Tabella 14 fornisce un riepilogo dei vari criteri di qualità e dei valori o risultati associati.

**Tabella 14. Riepilogo dei criteri di qualità**

<b>Criteri</b>	<b>Valori/resultati accettabili</b>
Variazioni nei valori $C_T$ fra replicati	$\leq 2 C_T$ se il valore $C_T$ medio $> 36$ $\leq 1,5 C_T$ se il valore $C_T$ medio $\leq 36$
Pendenza delle curve standard	Fra -3,0 e -3,9
$R^2$ per curve standard	Almeno $> 0,95$ , meglio se $> 0,98$
Diluizione standard SP1 (10 copie di plasmide BCR-ABL)	Deve essere rilevata e inclusa nella curva standard
Controllo qualità sul valore $ABL_{CN}$ per campioni dei pazienti, controllo RNA altamente positivo e calibratore IS-MMR	$ABL_{CN} > 10.000$ copie di ABL per ottenere il valore ottimale di sensibilità
Controllo PCR (acqua) e controllo della trascrittasi inversa (RT negativo)	Per ogni $ABL_{CN} = 0$ e $Mbcr_{CN} = 0$
NCN ottenuto per calibratore IS-MMR ( $NCN_{cal}$ )	Deve essere entro l'intervallo 0,05–0,3
Controllo RNA altamente positivo	Deve essere rilevato
NCN ottenuto per il controllo RNA altamente positivo convertito sulla scala internazionale (IS- $NCN_{HC}$ )	Stato: assenza di risposta molecolare maggiore

## Risoluzione dei problemi

Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) del nostro servizio di assistenza tecnica: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://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 44).

## Controllo qualità

Questo kit è prodotto in conformità allo standard ISO 13485:2003. In conformità con il Sistema di Gestione della Qualità di QIAGEN, dotato di certificazione ISO, ogni lotto di *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR è stato sottoposto a test sulla base di specifiche tecniche predefinite, in modo da garantire la costante qualità del prodotto. I certificati di analisi sono disponibili su richiesta sul sito [www.qiagen.com/support/](http://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) ((8, 9) ed è conforme alle raccomandazioni internazionali aggiornate. Il kit contiene un calibratore IS-MMR, standardizzato sulla scala internazionale, che permette di convertire i risultati NCN sulla scala internazionale e documentare lo stato MMR (risposta molecolare maggiore).

Ad ogni lotto del calibratore IS-MMR è assegnato un valore derivato direttamente da una calibrazione rispetto al materiale di riferimento primario certificato da NIBSC/OMS (International Genetic Reference Panel for the quantitation of BCR-ABL translocation by RQ-PCR (1st I.S.), rif. 09/138).

Ogni kit include un certificato di analisi indicante il valore assegnato al calibratore IS-MMR.

Il kit deve essere impiegato seguendo le istruzioni fornite nel presente manuale, assieme ai reagenti e agli strumenti convalidati (vedere "Materiali necessari ma non in dotazione", pag. 11). Qualsiasi impiego non previsto del prodotto e/o alterazione dei componenti esenteranno QIAGEN da qualsiasi responsabilità.

## Caratteristiche delle prestazioni

**Nota:** Le caratteristiche delle prestazioni sono state stabilite utilizzando il Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System in combinazione con il kit *ipsogen* BCR-ABL Mbc IS-MMR e gli altri reagenti convalidati (vedere "Materiali necessari ma non in dotazione", pag. 11).

## Limite del bianco e limite di rilevabilità

Il limite del bianco (LoB) e il limite di rilevabilità (LoD) sono stati calcolati secondo la linea guida CLSI/NCCLS EP17-A.

Il limite del bianco (LoB) è stato calcolato su campioni negativi di donatori sani (11 campioni, 69 misurazioni); è stato ottenuto un valore pari a 0,0022 NCN di BCR-ABL Mbc.

Il limite di rilevabilità (LoD o sensibilità analitica) è stato calcolato su noti campioni ad alta positività ( $n = 8,74$  misurazioni); è stato ottenuto un valore pari a 0,0069 NCN di BCR-ABL Mbc.

- **NCN  $\leq$  LoB:** BCR-ABL Mbc non rilevato
- **LoB < NCN < LoD:** BCR-ABL Mbc rilevato, ma non quantificato
- **NCN  $\geq$  LoD:** BCR-ABL Mbc quantificato

## Linearità

La linearità è stata calcolata secondo la linea guida CLSI/NCCLS EP6-A.

Lo studio è stato eseguito su miscele di RNA positivo e negativo estratto da linee cellulari. Sono stati testati in triplicato undici diversi livelli. I risultati ottenuti per questi campioni mostrano che il kit *ipsogen* BCR-ABL Mbc IS-MMR è lineare in un intervallo da 0,003 a 65 NCN di BCR-ABL Mbc.

## Quantità immesse

Per questo studio sono stati selezionati cinque diversi RNA con vari livelli di NCN di BCR-ABL. Sono state testate diverse quantità di RNA e cDNA per valutare l'impatto delle quantità immesse sui risultati NCN. I risultati hanno mostrato che la variazione della quantità di RNA immesso influenza in misura limitata i risultati NCN, mentre la maggiore o minore quantità di cDNA è un fattore più sensibile. Di conseguenza, per l'esecuzione del test si consiglia di utilizzare 1  $\mu$ g di RNA e 5  $\mu$ l di cDNA.

## Precisione

La precisione è stata calcolata secondo la linea guida CLSI/NCCLS EP5-A2.

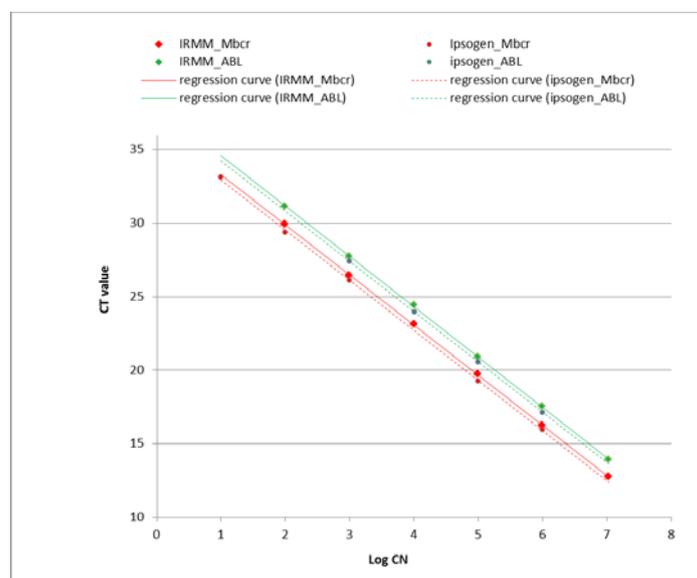
Lo studio di precisione è stato condotto su 13 diversi campioni testati 42 volte in duplicato ( $n = 84$ ). Questi campioni sono risultati rappresentativi del diverso livello di espressione di BCR-ABL Mbc nei campioni dei pazienti intorno e oltre il valore MMR. Il coefficiente di variazione totale intorno al valore MMR è risultato pari al 25%.

## Studio sulla concordanza: Confronto tra gli standard plasmide singolo ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM) e plasmide singolo *ipsogen* (QIAGEN).

Le più recenti definizioni degli standard di lavoro relativi alla risposta molecolare di BCR-ABL1 Mbcn nella patologia LMC sono state fornite dall'ELN/EUTOS Molecular Monitoring Steering Group, che raccomanda l'uso del plasmide ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM, Belgio): Cross, N.C., et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia (2015) *Leukemia*. **29**, 999.

Per ragioni di conformità a queste raccomandazioni, QIAGEN ha svolto uno studio sulla concordanza in cui il plasmide singolo, multi-target *ipsogen* utilizzato nel kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcn IS-MMR (24) CE (n. cat. 670723) è stato confrontato con il plasmide ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM).

Il confronto si basava sul rapporto ottenuto dal numero di copie normalizzato (NCN) di BCR-ABL1 Mbcn/ABL1, determinato utilizzando una delle due diluizioni degli standard (*ipsogen* o ERM-AD623 BCR-ABL1), sui campioni di controllo inclusi nei kit *ipsogen* e nel materiale di riferimento certificato proveniente dal NIBSC: White, H.E., et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.

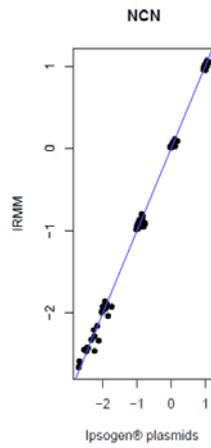


curva di regressione

Valore Ct

Log CN

**Figura 12.** Le curve standard dei plasmidi per *ipsogen* ed ERM-AD623 BCR-ABL1 sono allineate.



NCN  
IRMM  
Plasmidi *ipsogen*<sup>®</sup>  
*ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit

**Figura 13. Valori NCN di ERM-AD623 BCR-ABL1 / Valori NCN di *ipsogen*.**

Lo studio QIAGEN conclude che non ci sono differenze statistiche: gli standard basati sul plasmide singolo ERM-AD623 BCR-ABL1 e sul plasmide singolo *ipsogen* forniscono risultati equivalenti.

## Bibliografia

1. Baccarani, M. et al. (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **108**, 1809.
2. Baccarani, M. et al. (2009) Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6041.
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. Branford, S. et al. (2008) Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* **112**, 3330.
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. White, H.E. et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.
7. 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.
8. 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.
9. 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:



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](http://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](http://www.qiagen.com)).

## Informazioni per gli ordini

Prodotto	Indice	Cat. n°
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit (24)	Per 24 reazioni: standard di plasmidi singoli MbcR e ABL, controllo RNA altamente positivo, calibratore IS-MMR, miscela di primer e sonda ABL, miscela di primer e sonda gene di fusione BCR-ABL MbcR	670723
<b>Rotor-Gene Q MDx — per analisi della PCR in tempo reale convalidata per IVD in applicazioni cliniche</b>		
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
<b>Kit <i>ipsogen</i> RT — per trascrittasi inversa</b>		
<i>ipsogen</i> RT Kit	Trascrittasi inversa, primer qualsiasi, DTT, dNTP, inibitore della RNasi, tampone RT	679923
<b>Kit RNeasy — per la purificazione dell'RNA totale</b>		
RNeasy Midi Kit (50)	Per 50 preparazioni di RNA: 50 colonne RNeasy Midi Spin, provette di raccolta (15 ml), reagenti e tamponi privi di RNasi	75144

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i discolori 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](http://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®, Sample to Insight®, *ipsogen*®, RNeasy®, Rotor-Gene® (Gruppo QIAGEN); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, RNaseOUT™, ROX™, SuperScript®, SYBR®, TAMRA™, TRIzol® (Thermo Fisher Scientific Inc.); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Excel® (Microsoft Corporation); LightCycler®, TaqMan® (Gruppo Roche); Premix Ex Taq™ (Takara Bio, Inc.).

### **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 IS-MMR alle seguenti condizioni:

1. Il kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR deve essere usato unicamente secondo le istruzioni contenute nel *Manuale del kit ipsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR* 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 IS-MMR* 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-1362-003 © 2013–2016 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

---

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

