

# Manuale dell'*ipsogen*<sup>®</sup> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit



Versione 1

**IVD**

Diagnostica in vitro quantitativa

Per l'uso con gli strumenti Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, Applied Biosystems<sup>®</sup>, ABI PRISM<sup>®</sup> e LightCycler<sup>®</sup>

**CE**

**REF** 670823



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
GERMANIA

R3 **MAT** 1072511IT



## QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN è il leader mondiale nelle tecnologie per campioni e analisi destinate all'estrazione e all'individuazione del contenuto di qualsiasi campione biologico. I nostri prodotti e servizi avanzati di alta qualità sono una garanzia di successo, dal campione al risultato.

QIAGEN pone nuovi standard:

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

Il nostro obiettivo è il vostro successo. Per maggiori informazioni, visitate il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Contenuto

Uso previsto	5
Sommario e spiegazioni	5
Informazioni sulla CML	5
Monitoraggio della malattia	6
Principio della procedura	7
Materiali in dotazione	11
Contenuto del kit	11
Materiali necessari ma non in dotazione	13
Avvertenze e precauzioni	14
Precauzioni generali	14
Conservazione e manipolazione dei reagenti	15
Conservazione e manipolazione dei campioni	16
Procedura	17
Preparazione dell'RNA dei campioni	17
Protocollo:	
■ Trascrizione inversa	17
■ qPCR su strumenti Rotor Gene Q MDx 5plex HRM o Rotor-Gene Q 5plex HRM con rotore a 72 provette	20
■ qPCR su sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR e strumenti ABI PRISM 7900HT SDS e LightCycler 480	27
■ qPCR su strumenti LightCycler 1.2, 1.5 e 2.0	35
Interpretazione dei risultati	39
Principio dell'analisi dei dati	39
Curve degli standard e criteri di qualità applicabili ai dati grezzi	40
Numero copie normalizzato (NCN)	42
Conversione sulla scala IS e determinazione della MMR (risposta molecolare maggiore)	43
Riepilogo dei criteri di qualità	45
Risoluzione dei problemi	45
Controllo di qualità	46
Limitazioni	46

Caratteristiche delle prestazioni	47
Limite del bianco e limite di rilevabilità	47
Linearità	47
Quantità immesse	47
Precisione	48
Studio sulla concordanza: Confronto tra gli standard plasmide singolo ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM) e plasmide singolo <i>ipsogen</i> (QIAGEN)	48
Riferimenti	51
Simboli	52
Informazioni di contatto	52
Informazioni per gli ordini	53

## Uso previsto

L'*ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR DX Kit è destinato alla quantificazione dei trascritti BCR-ABL p210 b2a2 o b3a2 in campioni di midollo osseo (bone marrow, BM) o sangue periferico (peripheral blood, PB) di pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta (acute lymphoblastic leukemia, ALL) o leucemia mieloide cronica (chronic myeloid leukemia, CML), a cui è stato precedentemente diagnosticato un evento di fusione genica (FG) BCR-ABL Mbcr. 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 (minimal residual disease, 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 (Ph CHR5).

Questo cromosoma è il prodotto di una traslocazione reciproca tra i bracci lunghi dei cromosomi 9 e 22, t(9;22): la BCR (breakpoint cluster region), ossia la regione di raggruppamento dei punti di rottura, è localizzata sul cromosoma 22, mentre l'oncogene c-ABL proviene dal cromosoma 9. Il gene di fusione corrispondente, BCR-ABL, è 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. Dal punto di vista clinico è caratterizzata da un eccesso 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, sempre con esito fatale. L'avvento di imatinib e più recentemente degli inibitori tirosin-chinasici (tyrosine kinase inhibitors, 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 a 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 a una riduzione del numero di cellule leucemiche e di trascritti BCR-ABL, come specificato nella Figura 1.

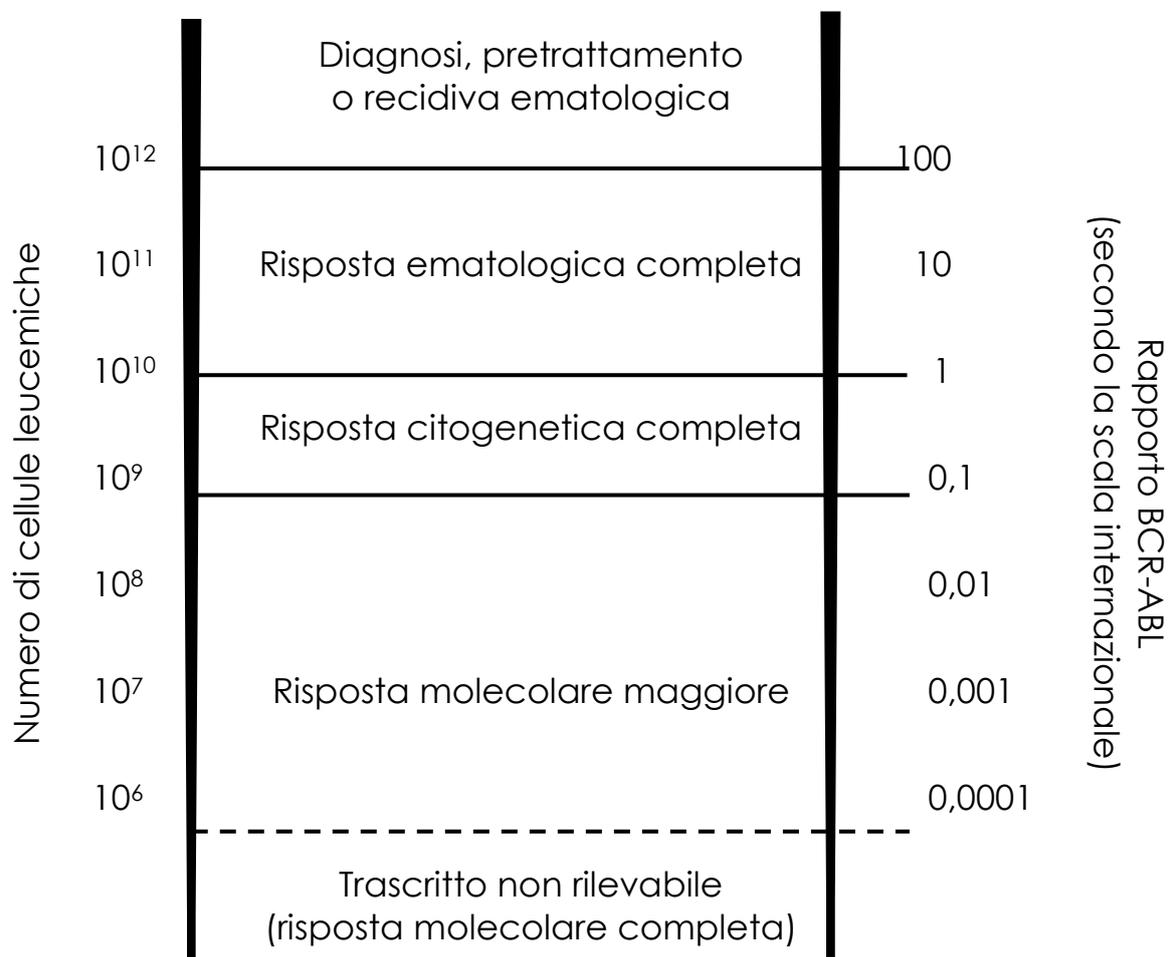


Figura 1. Adattamento dal rif. 1.

Il metodo standard per stimare il carico tumorale nei pazienti CML è l'analisi citogenetica convenzionale (G-banding) su metafasi di midollo osseo (bone marrow, BM). La risposta citogenetica viene valutata almeno su 20 metafasi di midollo. Il livello di risposta citogenetica è

stimato 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 (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) in tempo reale, che consente di quantificare l'mRNA del trascritto BCR-ABL MbcR su campioni di sangue periferico (peripheral blood, PB), fa ormai parte delle tecniche di monitoraggio della malattia in pazienti CML sottoposti a trattamento. È meno invasiva e più sensibile rispetto alla citogenetica convenzionale delle metafasi di 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 MbcR (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

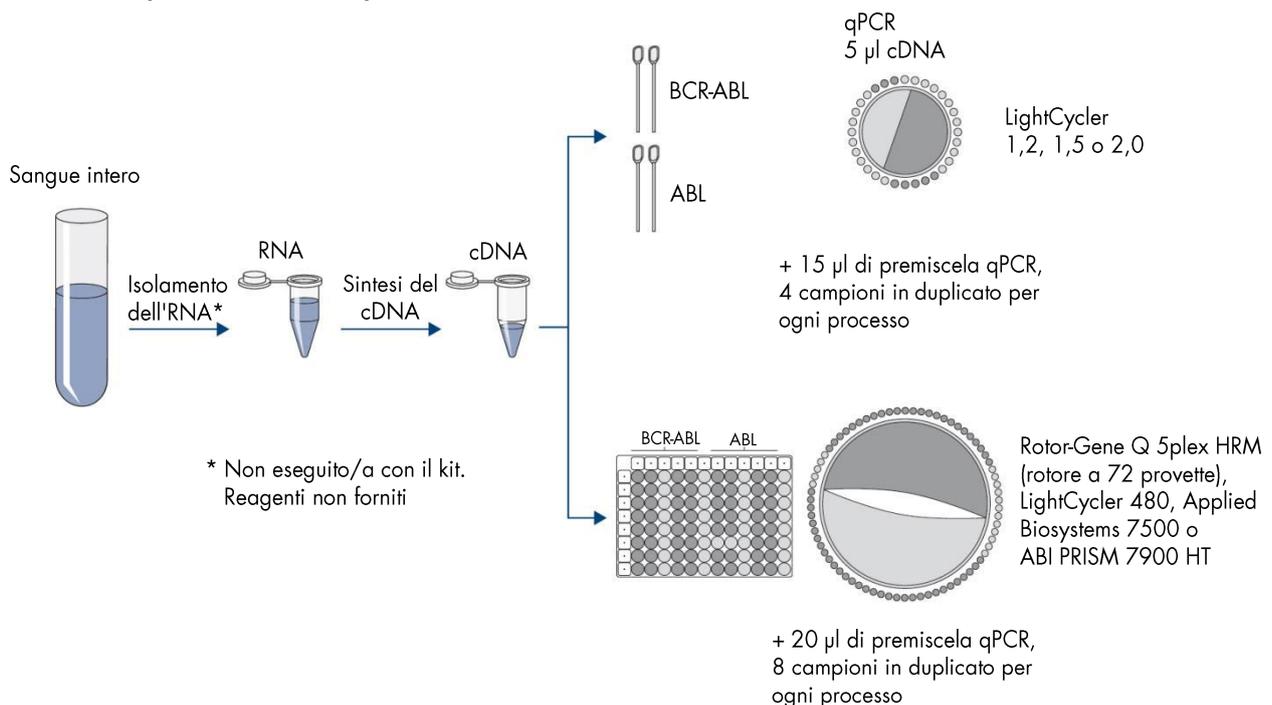


Figura 2. Isolamento dell'RNA, sintesi del cDNA e qPCR.

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 elaborazione post-PCR, mediante la rilevazione real-time dei segnali fluorescenti durante e/o dopo il ciclaggio 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 utilizza la qPCR basata sul principio dell'idrolisi dell'oligonucleotide a doppio fluorocromo. Durante la PCR, i primer diretti e inversi ibridizzano secondo una sequenza specifica. Un oligonucleotide a doppio fluorocromo è contenuto nella stessa miscela. Questa sonda, costituita da un oligonucleotide le cui estremità sono marcate da un fluorocromo reporter all'estremità 5' e da un fluorocromo quencher all'estremità 3', ibridizza sulla sequenza target nel prodotto della PCR. L'analisi qPCR con sonde idrolitiche sfrutta l'attività di esonucleasi 5' → 3' della DNA polimerasi del batterio *Thermus aquaticus* (Taq). Quando la sonda è intatta, la vicinanza tra il reporter e il quencher permette al quencher di sopprimere la fluorescenza del reporter, principalmente per un trasferimento di energia di tipo Förster.

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

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

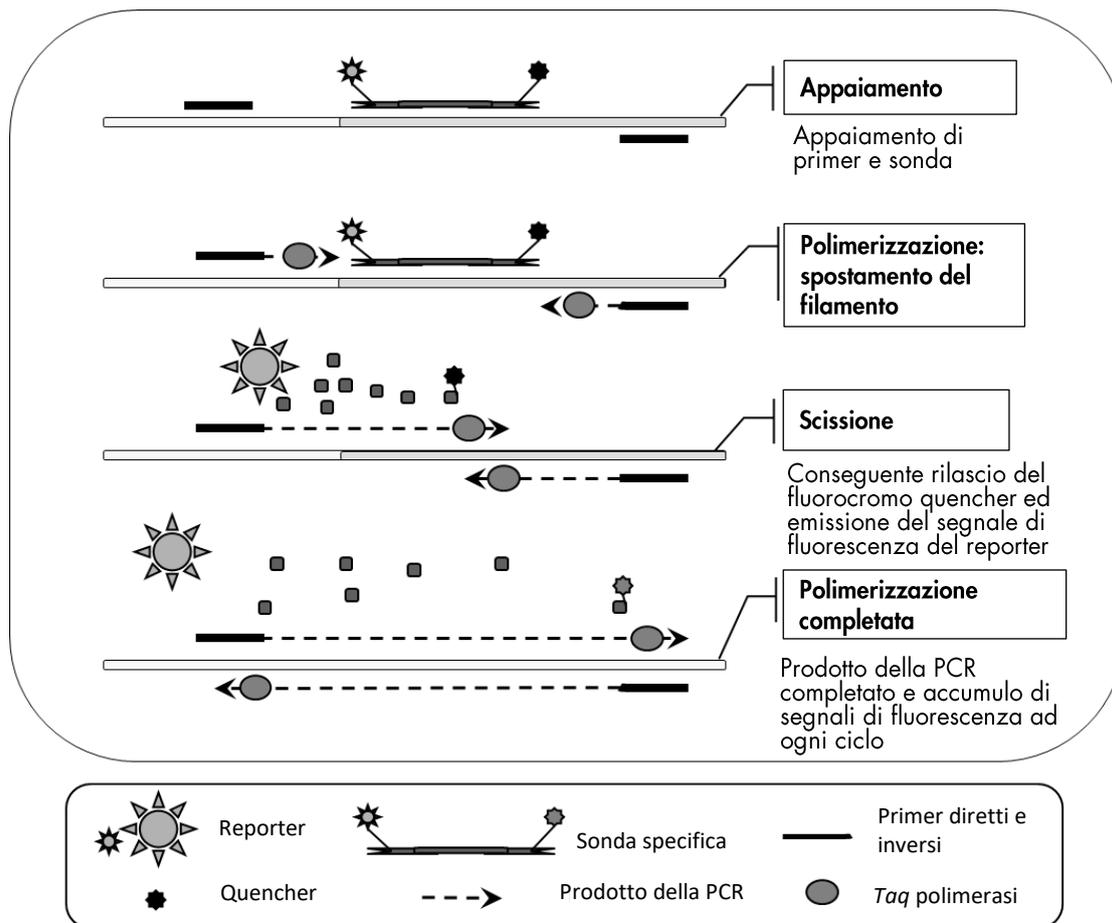


Figura 3. Principio della reazione. L'RNA totale viene retrotrascritto e il cDNA generato viene amplificato mediante PCR per mezzo di una coppia di primer specifici e di una sonda interna specifica a doppio fluorocromo (FAM™-TAMRA™). La sonda si lega all'amplicone a ogni fase di ibridazione della PCR. Quando la Taq si estende dal primer legato all'amplicone, sposta l'estremità 5' della sonda, che viene quindi degradata dall'attività di esonucleasi 5'→3' della Taq DNA polimerasi. La scissione prosegue finché la sonda rimanente non si dissolve separandosi dall'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

<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit		(24)
N° di catalogo		670823
Numero di reazioni		24
Reverse transcription		
Reverse Transcriptase (Trascrittasi inversa)		36 µl
5x RT Buffer for reverse transcription (5x Tampone RT per trascrizione inversa)		180 µl
Miscela dNTP*		72 µl
Primer Random†		190 µl
Inibitore RNasi		18 µl
DTT‡		45 µl
Calibrazione		
High Positive RNA Control (Controllo RNA altamente positivo)		10 µl × 3
IS-MMR Calibrator (Calibratore IS-MMR)		10 µl × 3
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

\* Deossinucleotidi 10 mM cad.

† Oligonucleotide nonamero Random.

‡ Ditiotreitolo.

### Contenuto del kit (continua)

Reagenti per qPCR		
Master Mix for qPCR (Miscela master per qPCR)	Miscela qPCR 2x	2 x 1275 µl
Primers and Probe Mix ABL (Miscela di primer e sonda ABL) <sup>§</sup>	PPC-ABL 25x	110 µl
Primers and Probe Mix BCR-ABL Mbc Fusion Gene (Miscela di primer e sonda gene di fusione BCR-ABL Mbc) <sup>¶</sup>	PPF-Mbc 25x	110 µl
ROX™ I fluorescent dye for ABI PRISM instruments (Fluorocromo ROX™ I per strumenti ABI PRISM)	ROXI	102 µl
ROX II fluorescent dye for Applied Biosystems instruments (Fluorocromo ROX II per strumenti Applied Biosystems)	ROXII	102 µl
Nuclease-free PCR grade water (Acqua per PCR priva di nucleasi)		1400 µl
ipsogen <i>BCR-ABL1 Mbc IS-MMR DX Kit Handbook</i> (English) (Manuale dell'ipsogen <i>BCR-ABL1 mbc IS-MMR DS Kit</i> (inglese))		1

<sup>§</sup> Miscela di primer inversi e diretti specifici per il gene di controllo ABL più una sonda FAM-TAMRA specifica.

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

Nota: miscelare delicatamente e centrifugare brevemente la trascrittasi inversa e le provette di miscela master, gli standard (SP1-SP6) e le miscele di primer e sonda prima dell'uso.

## Materiali necessari ma non in dotazione

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede di dati di sicurezza (safety data sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

### Reagenti

- Reagenti per la purificazione dell'RNA: i reagenti validati sono l'RNeasy Midi Kit, QIAGEN, n. cat. 75144 o il reagente TRIzol®, Thermo Fisher Scientific, n. cat. 15596-018 o 15596-026
- Acqua per PCR priva di nucleasi

### Materiali di consumo

- Puntali per pipette 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 a microlitri\* dedicate per la PCR (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)
- 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 Real-time:\* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o altro strumento RotorGene; LightCycler 1.2, 1.5, 2.0 o 480; sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR; ABI PRISM 7900HT SDS; e materiale specifico associato
- Termociclatore\* o bagnomaria\* (fase di trascrizione inversa)

\* Assicurarsi che gli strumenti siano stati controllati e calibrati nel rispetto delle istruzioni del produttore.

## Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede di sicurezza sul prodotto (SDS). Le schede sono disponibili online nel pratico formato PDF sul sito [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), dove è possibile cercare, visualizzare e stampare la scheda SDS di ogni kit e di ogni componente del kit QIAGEN.

Smaltire campioni e materiali di scarto nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.

Ai componenti dell'*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit sono associate le seguenti informazioni su rischi e misure precauzionali.

DTT 0.1M RT

Attenzione! Provoca irritazione cutanea lieve. In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.

### Precauzioni generali

Per effettuare i test qPCR, compresa la manutenzione dell'apparecchiatura, è necessario attenersi alle buone pratiche di laboratorio che sono specifiche per la biologia molecolare e sono conformi alle leggi e agli standard pertinenti.

Questo kit è destinato all'uso nella diagnostica in vitro. Le istruzioni e i reagenti forniti nel kit sono stati verificati e approvati per garantire prestazioni ottimali. L'ulteriore diluizione dei reagenti o la modifica dei tempi di incubazione e delle temperature potrebbe determinare dati errati o discordanti. I reagenti PPC e PPF potrebbero modificarsi se esposti alla luce. Tutti i reagenti sono stati formulati specificamente per l'uso con questo test. Per garantire prestazioni ottimali del test, evitare qualsiasi sostituzione.

La determinazione dei livelli di trascritti mediante qPCR richiede sia la trascrizione inversa dell'mRNA che l'amplificazione del cDNA generato

mediante PCR. Di conseguenza l'intera procedura di analisi deve avvenire in totale assenza di RNasi/DNasi.

Prestare estrema attenzione al fine di evitare:

- Contaminazione da RNasi/DNasi, che potrebbe causare la degradazione dell'mRNA templato e del cDNA generato.
- Contaminazione da carryover di mRNA o PCR, che potrebbe determinare un 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 materiale usato solo per questo scopo (pipette, puntali, ecc.) in un'area dedicata, in cui non siano presenti matrici di DNA (cDNA, DNA, plasmidi). Aggiungere il templato in un'area separata (preferibilmente in un'altra stanza) con materiale specifico (pipette, puntali e così via).
- Manipolare gli standard (SP1–SP6) in una stanza separata.

## Conservazione e manipolazione dei reagenti

I kit vengono spediti in ghiaccio secco e, alla ricezione, devono essere conservati a una temperatura compresa tra -15 °C e -30 °C.

- 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 nei contenitori originali.

Le condizioni di conservazione indicate valgono sia per i componenti aperti, sia per quelli integri. I componenti conservati in condizioni diverse da quelle indicate sulle etichette potrebbero fornire prestazioni di qualità inferiore e compromettere i risultati del saggio.

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

Il prodotto non fornisce segni evidenti di instabilità. Tuttavia è opportuno eseguire i controlli positivi e negativi contestualmente ai campioni sconosciuti.

## 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 dei 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. Prima di eseguire l'analisi, si consiglia, pertanto, di qualificare l'RNA purificato mediante elettroforesi su gel di agarosio\*, utilizzando Agilent® Bioanalyzer®, o mediante spettrofotometria.†

## Protocollo: Trascrizione inversa

Prima di iniziare

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

Procedura

1. Scongela tutti i componenti necessari e collocarli sul 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 µg/µl. Pipettare 10 µl (1 µg) di ciascun campione di RNA in provette separate etichettate. Pipettare 10 µl del controllo altamente positivo, 10 µl del calibratore IS-MMR e 10 µl di acqua priva di nucleasi (come controllo RT negativo) in provette separate etichettate, e analizzarli in parallelo con i campioni di RNA, come descritto di seguito.
4. Incubare ogni campione, controllo e calibratore (10 µl ciascuno) per 5 min a 65 °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).

\* Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi.

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

Tabella 1. Preparazione della miscela RT

Componente	Volume per campione (µl)	Concentrazione finale
Tampone RT, 5x (fornito con trascrittasi inversa)	5,0	1x
dNTP (10 mM ciascuno, da preparare precedentemente e conservare in aliquote a -20 °C)	2,0	0,8 mM
Nonamero random (100 µM)	5,25	21 µM
Inibitore della RNasi (40 U/µl)	0,5	0,8 U/µl
Trascrittasi inversa (200 U/µl)	1,0	8 U/µl
DTT (fornito con trascrittasi inversa)	1,25	–
Campione di RNA riscaldato, controllo o calibratore IS-MMR (da aggiungere nella fase 7)	10,0	40 ng/µl
Volume finale	25,0	–

7. Dispensare 15 µl della miscela RT in ogni provetta per PCR. Aggiungere poi 10 µl (1 µg) 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 trascrizione inversa indicato nella Tabella 2.

Tabella 2. Profilo di temperature

Trascrizione inversa 1	Temperatura: 25 °C Durata: 10 min
Trascrizione inversa 2	Temperatura: 50 °C Durata: 60 min
Inattivazione	Temperatura: 85 °C Durata: 5 min
Raffreddamento	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 descritti di seguito 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 uno di questi strumenti, si suggerisce di effettuare tutte le misurazioni in duplicato, come indicato nella Tabella 3. Il kit è concepito per analizzare nello stesso esperimento otto diversi campioni di cDNA tre volte.

Tabella 3. Numero di reazioni per ogni strumento Rotor-Gene Q con rotore da 72 provette

Campioni	Reazioni
Con la miscela di primer e sonda ABL (PPC-ABL) (32 reazioni)	
8 campioni di cDNA	8 × 2 reazioni
1 controllo cDNA altamente positivo	2 reazioni
1 calibratore IS-MMR cDNA	2 reazioni
Standard plasmidi 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
Con la miscela di primer e sonda MbcR (PPF-MbcR) BCR-ABL (32 reazioni)	
8 campioni di cDNA	8 × 2 reazioni
1 controllo cDNA altamente positivo	2 reazioni
1 calibratore IS-MMR cDNA	2 reazioni
Standard plasmidi 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 otto 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.

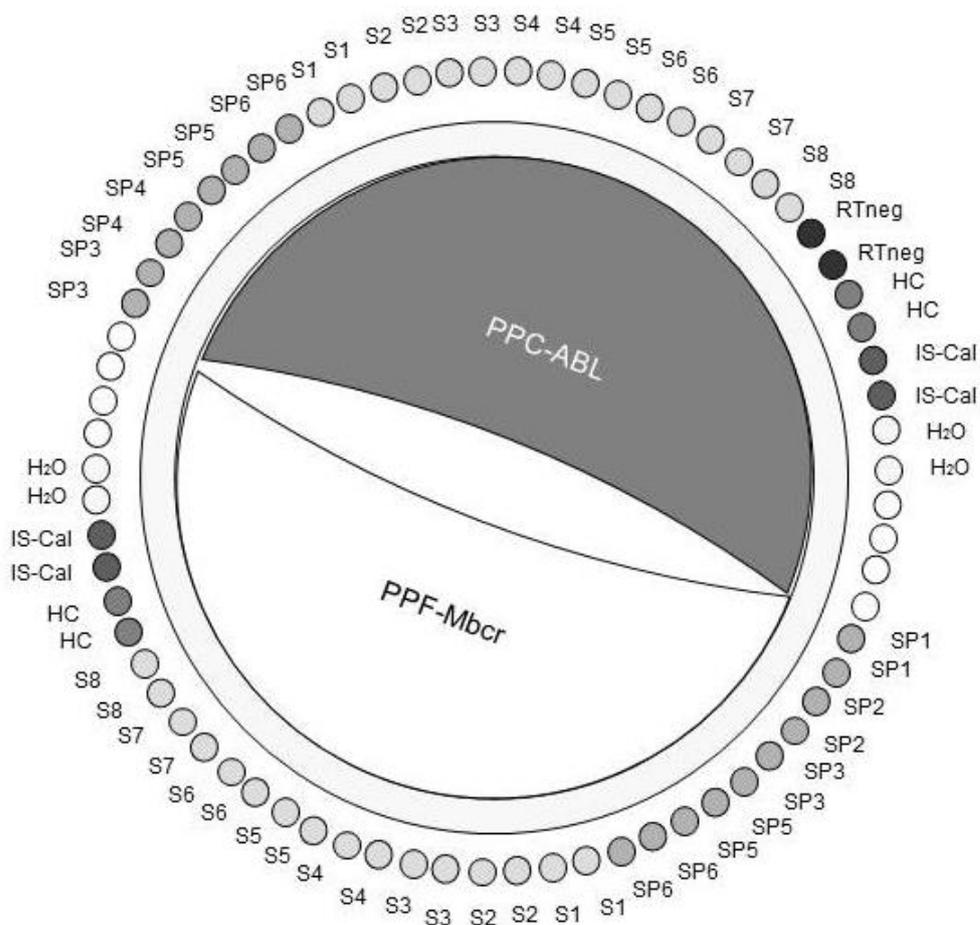


Figura 4. Configurazione del rotore consigliata per ogni esperimento con il kit *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX. SP1–SP6: standard BCR-ABL MbcR e ABL; HC: controllo cDNA altamente positivo; IS-Cal: calibratore IS-MMR; RTneg: controllo RT-negativo; S: campione cDNA; H<sub>2</sub>O: controllo di acqua.

Nota: fare attenzione a inserire sempre un campione da analizzare nella posizione 1 del rotore. In caso contrario, nella fase di calibrazione lo strumento potrebbe non eseguire la calibrazione e verrebbero acquisiti dati di fluorescenza non corretti.

In tutte le altre posizioni inserire delle provette vuote.

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

Nota: eseguire tutti i passaggi su ghiaccio.

#### Procedura

1. Scongellare tutti i componenti necessari e collocarli sul 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 riferite al volume finale della reazione.

La Tabella 4 descrive lo schema di pipettamento per la preparazione di una miscela di reagenti calcolata in modo da ottenere un volume 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 pipettamento.

Tabella 4. Preparazione della miscela qPCR

Componente	1 reazione ( $\mu$ l)	ABL: 32 + 1 reazioni ( $\mu$ l)	BCR-ABL Mbcr: 32 + 1 reazioni ( $\mu$ l)	Concentrazione finale
Miscela qPCR, 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 al passaggio 5)	5	5 cad.	5 cad.	–
Volume totale	25	25 cad.	25 cad.	–



4. Dispensare 20 µl della premiscela qPCR in ogni provetta.
5. Aggiungere 5 µl del prodotto RT (cDNA, equivalente a 200 ng di RNA) ottenuto nella trascrizione inversa (vedere "Protocollo: Trascrizione inversa", pag. 17) nella provetta corrispondente (volume totale 25 µl).
6. Miscelare delicatamente pipettando su e giù.
7. Posizionare le provette 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 di temperature

Modalità di analisi	Quantificazione
Hold (Mantenimento 1)	Temperatura: 95°C Durata: 10 s
Cycling (Ciclizzazione)	50 volte 95 °C per 5 s 60 °C per 30 s con acquisizione della fluorescenza FAM nel canale Green (verde): Singolo
Hold (Mantenimento 2)	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. Si consiglia di impostare la soglia a 0,03.

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

In caso di utilizzo di un dispositivo qPCR a 96 pozzetti, si suggerisce di eseguire tutte le misurazioni in duplicato, come indicato nella Tabella 6. Il kit è concepito per analizzare nello stesso esperimento otto diversi campioni di cDNA tre volte.

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

Campioni	Reazioni
Con la miscela di primer e sonda ABL (PPC-ABL) (32 reazioni)	
8 campioni di cDNA	8 × 2 reazioni
1 controllo cDNA altamente positivo	2 reazioni
1 calibratore IS-MMR cDNA	2 reazioni
Standard plasmidi 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
Con la miscela di primer e sonda MbcR (PPF-MbcR) BCR-ABL (32 reazioni)	
8 campioni di cDNA	8 × 2 reazioni
1 controllo cDNA altamente positivo	2 reazioni
1 calibratore IS-MMR cDNA	2 reazioni
Standard plasmidi 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 otto 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.

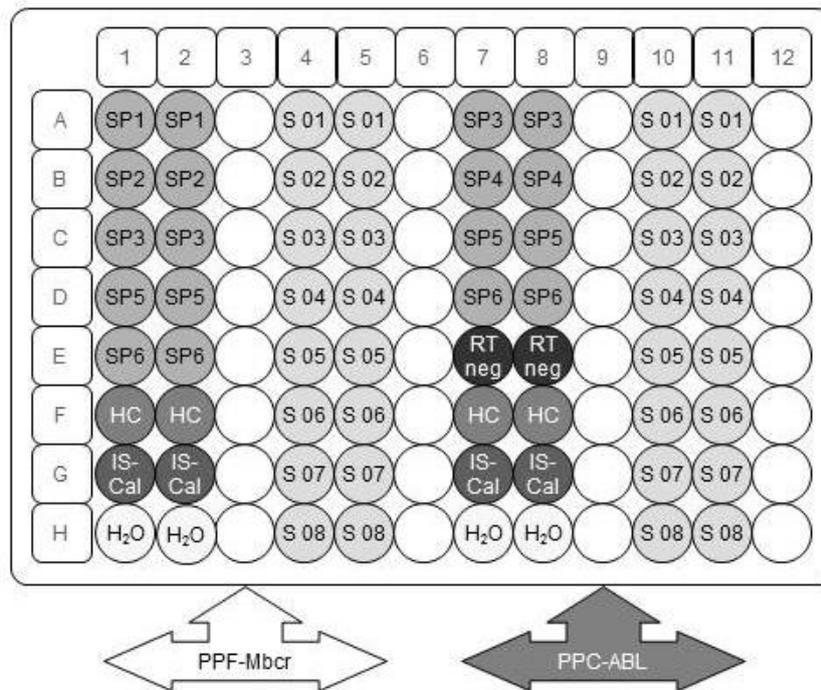


Figura 5. Configurazione consigliata della piastra per un esperimento con il kit *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX. SP1-SP6: standard BCR-ABL MbcR e ABL; HC: controllo cDNA altamente positivo; IS-Cal: calibratore IS-MMR; RTneg: controllo RT-negativo; S: campione cDNA; H<sub>2</sub>O: controllo di acqua.

qPCR su strumenti Applied Biosystems, ABI PRISM o LightCycler 480

Nota: eseguire tutti i passaggi su ghiaccio.

### Procedura

1. Scongela tutti i componenti necessari e collocarli sul 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. Se si utilizza un dispositivo qPCR a 96 pozzetti, si suggerisce di effettuare tutte le misurazioni in duplicato.

Tutte le concentrazioni sono riferite al volume finale della 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 pipettamento.

Tabella 7. Preparazione della miscela qPCR per gli strumenti Applied Biosystems e ABI PRISM

Componente	1 reazione ( $\mu$ l)	ABL: 32 + 1 reazioni ( $\mu$ l)	BCR-ABL Mbc: 32 + 1 reazioni ( $\mu$ l)	Concentrazione finale
Miscela qPCR, 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 al passaggio 5)	5	5 cad.	5 cad.	–
Volume totale	25	25 cad.	25 cad.	–

Tabella 8. Preparazione della miscela qPCR per LightCycler 480

Componente	1 reazione ( $\mu$ l)	ABL: 32 + 1 reazioni ( $\mu$ l)	BCR-ABL Mbc: 32 + 1 reazioni ( $\mu$ l)	Concentrazione finale
Miscela qPCR, 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 al passaggio 5)	5	5 cad.	5 cad.	–
Volume totale	25	25 cad.	25 cad.	–

4. Dispensare 20  $\mu$ l della premiscela qPCR in ogni pozzetto.
5. Aggiungere 5  $\mu$ l del prodotto RT (cDNA, equivalente a 200 ng di RNA) ottenuto nella trascrizione inversa (vedere "Protocollo: Trascrizione inversa", pag. 17) nel pozzetto corrispondente (volume totale 25  $\mu$ l).
6. Miscelare delicatamente pipettando su e giù.
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 di temperature per gli strumenti Applied Biosystems e ABI PRISM

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

Tabella 10. Profilo termico per lo strumento LightCycler 480

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

9. Per Applied Biosystems 7500 e ABI PRISM 7900HT SDS, seguire il passaggio 9a. Per lo strumento LightCycler 480, seguire la fase 9b.
- 9a. Applied Biosystems e ABI PRISM: si consiglia un valore soglia impostato su 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 quattro diversi campioni di cDNA sei volte.

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

Campioni	Reazioni
Con la miscela di primer e sonda ABL (PPC-ABL) (16 reazioni)	
4 campioni di cDNA	4 × 2 reazioni
1 controllo cDNA altamente positivo	1 reazione
1 calibratore IS-MMR cDNA	1 reazione
Standard plasmidi singoli	1 x 4 reazioni (SP3, SP4, SP5 e SP6)
Controllo RT-negativo	1 reazione
Acqua come materiale di controllo	1 reazione
Con la miscela di primer e sonda Mbc (PPF-Mbc) BCR-ABL (16 reazioni)	
4 campioni di cDNA	4 × 2 reazioni
1 controllo cDNA altamente positivo	1 reazione
1 calibratore IS-MMR cDNA	1 reazione
Standard plasmidi 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 quattro campioni di cDNA nel medesimo esperimento per ottimizzare l'utilizzo degli standard e



Tabella 12. Preparazione della miscela qPCR per gli strumenti LightCycler 1.2, 1.5 e 2.0

Componente	1 reazione (µl)	ABL: 16 + 1 reazioni (µl)	BCR-ABL Mbc: 16 + 1 reazioni (µl)	Concentrazione finale
Miscela qPCR, 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 al passaggio 5)	5	5 cad.	5 cad.	–
Volume totale	20	20 cad.	20 cad.	–

4. Dispensare 15 µl della premiscela qPCR in ogni capillare.
5. Aggiungere 5 µl del prodotto RT (cDNA, equivalente a 200 ng di RNA) ottenuto nella trascrizione inversa (vedere "Protocollo: Trascrizione inversa", pag. 17) nel capillare corrispondente (volume totale 20 µl).
6. Miscelare delicatamente pipettando su e giù.
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 di temperature

Modalità di analisi	Quantificazione
Hold (Mantenimento) 1	Temperatura: 95 °C Durata: 10 s Rampa: 20
Cycling (Ciclizzazione)	50 volte 95 °C per 5 s; rampa: 20 60 °C per 30 s; rampa: 20; con acquisizione della fluorescenza FAM: Singolo
Hold (Mantenimento) 2	Temperatura: 36 °C Durata: 1 min Rampa: 20

10. Per lo strumento LightCycler 1.2 e 1.5, seguire il passaggio 10a. Per LightCycler 2.0, seguire il passaggio 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 Automated (F''max) analysis (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 dell'analisi dei dati

In base alla tecnologia TaqMan®, il numero di cicli PCR necessari per rilevare un segnale oltre la soglia è definito "ciclo soglia" (Cycle Threshold,  $C_T$ ) ed è direttamente proporzionale alla quantità di target presenti all'inizio della reazione.

Usando standard con un numero noto di molecole è possibile determinare la curva di uno standard e stabilire il numero preciso di target presenti nel campione analizzato. Le curve standard *ipsogen* si basano su plasmidi. Per ottenere curve standard accurate si utilizzano quattro diluizioni standard per ABL e cinque diluizioni standard per Mbc. Il kit include inoltre un calibratore IS-MMR che consente di convertire i risultati sulla scala internazionale. Nelle Figure 7 e 8 sono illustrate alcune curve di amplificazione TaqMan di esempio simili alle curve che si ottengono con l'*ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR DX Kit per gli standard, per il calibratore IS-MMR e per il controllo RNA altamente positivo.

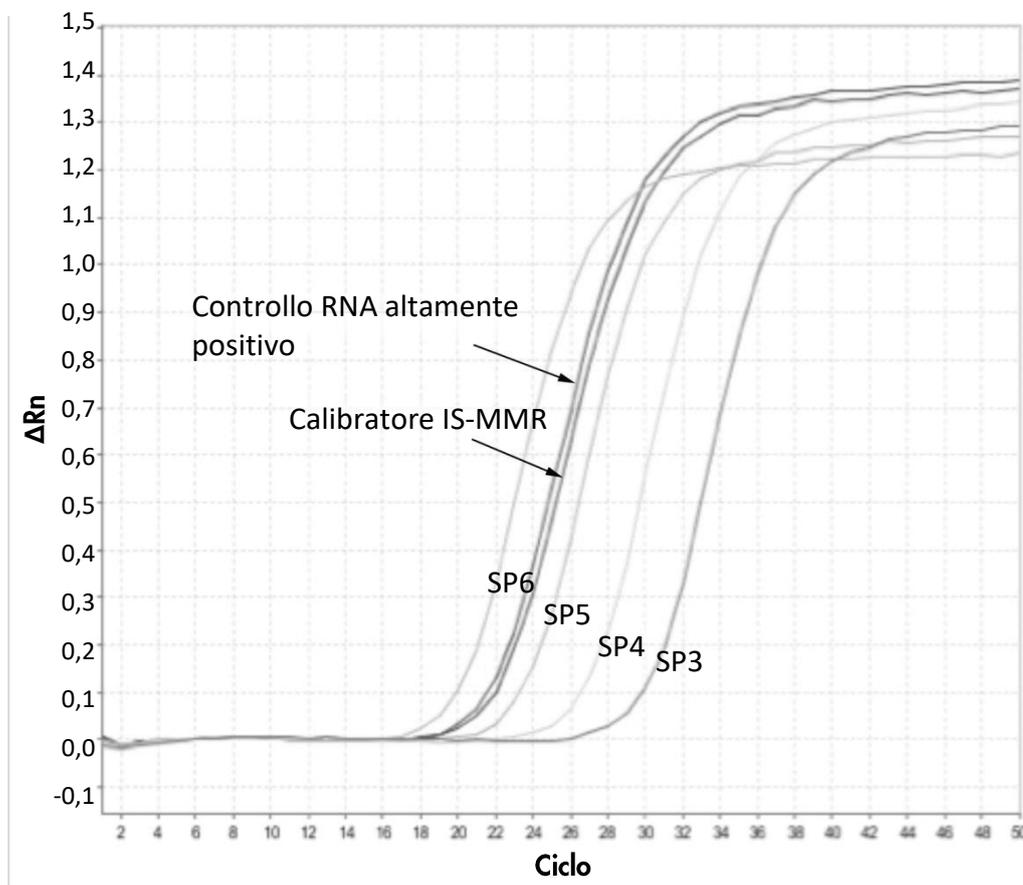


Figura 7. Rilevazione di ABL con gli standard SP3, SP4, SP5 e SP6.  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  copie/5  $\mu$ l.

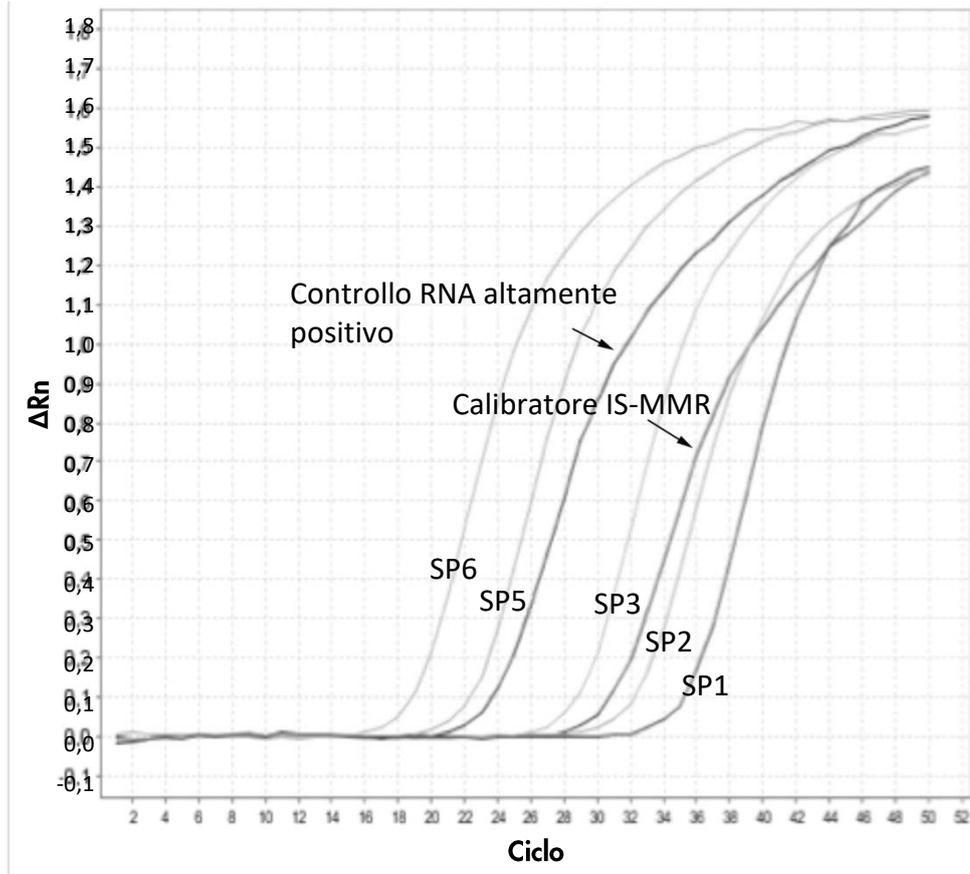


Figura 8. Rilevazione di BCR-ABL MbcR con gli standard SP1, SP2, SP3, SP5 e SP6.  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  copie/5  $\mu$ l.

## Curve degli standard e criteri di qualità applicabili ai dati grezzi

### Riproducibilità tra ripetizioni

La variazione dei valori  $C_T$  tra i replicati deve essere  $<2$ , il che corrisponde a 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

È possibile incollare i dati grezzi in un file di Excel® per analizzarli.

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 per ABL calcolata con 4 diluizioni standard. La Figura 10 mostra un esempio della curva teorica per BCR-ABL Mbcr calcolata con 5 diluizioni standard.

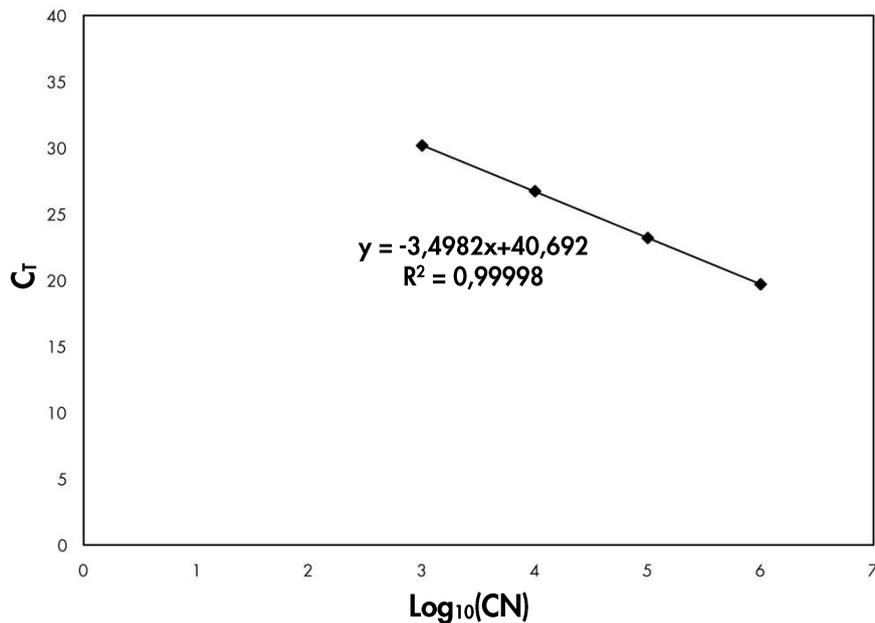


Figura 9. Curva teorica per ABL calcolata con 4 diluizioni standard. Si calcola una curva di regressione lineare ( $y = ax + b$ ), dove  $a$  è la pendenza della linea e  $b$  è l'intercetta  $y$ , ossia la coordinata  $y$  del punto in cui la linea attraversa l'asse  $y$ . La relativa equazione e il coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) sono riportati nel grafico.

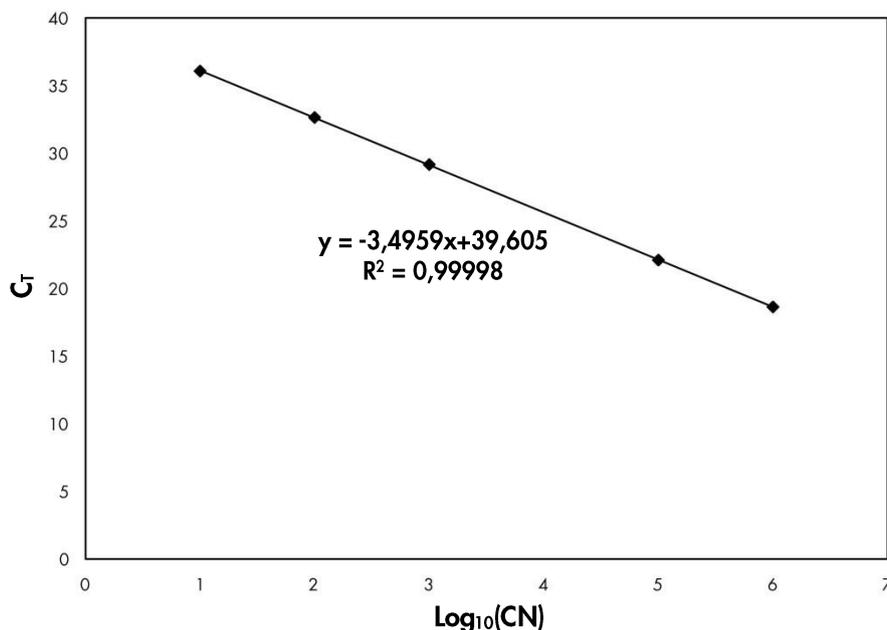


Figura 10. Curva teorica per BCR-ABL Mbcr calcolata con 5 diluizioni standard. Si calcola una curva di regressione lineare ( $y = ax + b$ ), dove  $a$  è la pendenza della linea e  $b$  è l'intercetta  $y$ , ossia la coordinata  $y$  del punto in cui la linea attraversa l'asse  $y$ . La relativa equazione e il coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) sono riportati nel grafico.

Dal momento che gli standard sono diluizioni  $\times 10$ , la pendenza teorica della curva è  $-3,3$ . Una pendenza tra  $-3,0$  e  $-3,9$  può essere accettabile, posto che  $R^2$  sia  $>0,95$  (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 controlli acqua

I controlli no template (no template controls, NTC) per la fase PCR (acqua come materiale di controllo) e la fase di trascrizione inversa (controllo RT negativo) devono dare un valore CN pari a zero sia per ABL che BCR-ABL Mbc. Un eventuale risultato positivo per questi controlli NTC indicherebbe una contaminazione crociata in fase di trascrizione inversa e/o qPCR.

## Numero 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 Mbc 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 tra 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 trascrizione inversa e le fasi di amplificazione di ABL e BCR-ABL MbcR durante la quantificazione dei trascritti.

Controllo qualità sul risultato  $NCN_{cal}$

Nota: il risultato NCN ottenuto per il calibratore IS-MMR, testato con l'*ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR DX Kit in combinazione con i reagenti e gli strumenti convalidati (vedere "Materiali in dotazione", pag. 11 e "Materiali necessari ma non in dotazione", pag. 13), 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 dell'interpretazione, fare riferimento al valore riportato sull'etichetta della provetta del calibratore IS-MMR o al certificato di analisi fornito con il 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 ( $IS-NCN_{campione}$ ).

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

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
- $IS-NCN_{campione} \geq 0,15$ : nessuna 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  $IS-NCN$ .

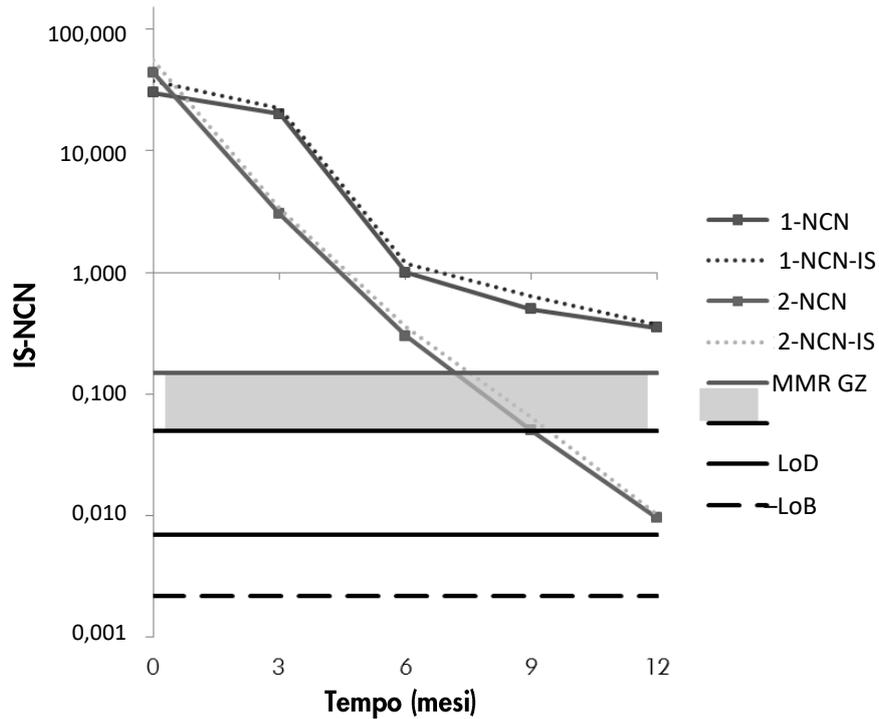


Figura 11. Curve di monitoraggio relative allo stato MMR del paziente con l'ipsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR DX Kit. NCN: numero di copie normalizzato; NCN-IS: numero di copie normalizzato sulla scala internazionale; MMR GZ: zona grigia (GZ) MMR, risultato non conclusivo; LoD: limite di rilevabilità; LoB: 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. Riassunto dei criteri di qualità

Criteri	Valori/resultati accettabili
Variazioni dei valori $C_T$ tra ripetizioni	$\leq 2 C_T$ se il valore $C_T$ medio $>36$ $\leq 1,5 C_T$ se il valore $C_T$ medio $\leq 36$
Pendenza 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 rientrare nell'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: nessuna risposta molecolare maggiore

## Risoluzione dei problemi

Per maggiori informazioni, consultare la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Gli esperti del supporto tecnico QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante le informazioni e il protocollo descritto in questo manuale o le tecnologie relative a campioni e analisi (per le informazioni sui contatti, vedere "Informazioni di contatto", pagina 52).

## Controllo di qualità

In conformità con il Sistema di Gestione della Qualità di QIAGEN, dotato di certificazione ISO, ogni lotto di *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit 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/).

## Limitazioni

Prima di iniziare a utilizzare il dispositivo, gli utenti del kit devono ricevere un'adeguata formazione e avere dimestichezza con questa tecnologia.

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'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia coperta dagli studi di valutazione delle prestazioni QIAGEN.

Prestare attenzione alle date di scadenza stampate sulle confezioni e sulle etichette di tutti i componenti. Non utilizzare componenti 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. 13). 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 sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR in combinazione con l'*ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR Kit e gli altri reagenti convalidati (vedere "Materiali necessari ma non in dotazione", pag. 13).

### Limite del bianco e limite di rilevabilità

Il limite del bianco (limit of blank, LoB) e il limite di rilevabilità (limit of detection, 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 MbcR.

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 MbcR.

- $NCN \leq LoB$ : BCR-ABL MbcR non rilevato
- $LoB < NCN < LoD$ : BCR-ABL MbcR rilevato, ma non quantificato
- $NCN \geq LoD$ : BCR-ABL MbcR 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 test *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR è lineare in un intervallo da 0,003 a 65 NCN di BCR-ABL MbcR.

### 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 µg di RNA e 5 µl 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 MbcR 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 operative della risposta molecolare di BCR-ABL1 MbcR nella patologia LMC sono state fornite dall'ELN/EUTOS del 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 nell'*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit (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 MbcR/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.

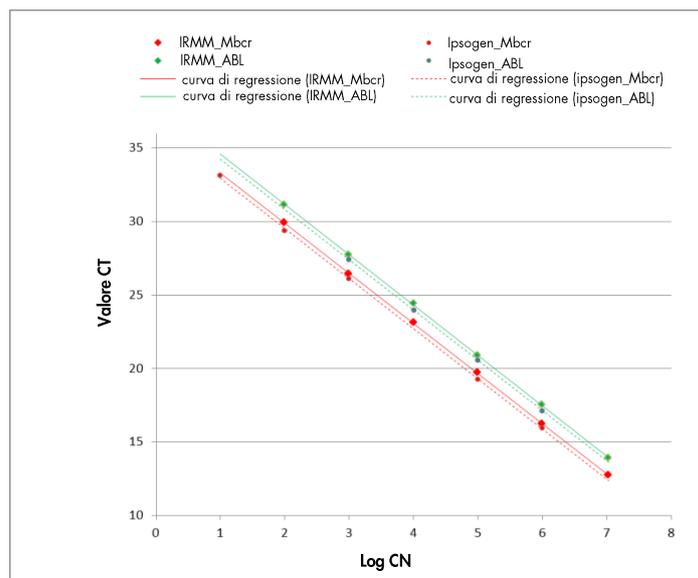
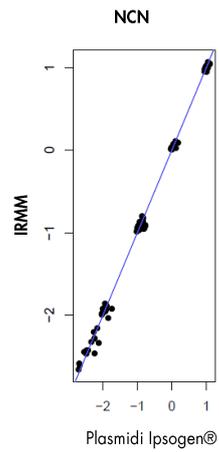


Figura 12. le curve standard di plasmidi *ipsogen* ed ERM-AD623 BCR-ABL1 sono allineate.



*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit.

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

La conclusione dello studio QIAGEN è che non c'è nessuna differenza statistica: gli standard basati sul plasmide singolo ERM-AD623 BCR-ABL1 e sul plasmide singolo *ipsogen* forniscono risultati equivalenti.

## Riferimenti

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

I seguenti simboli potrebbero comparire sulle confezioni e sulle etichette:



Contenuto sufficiente per <N> reazioni



Data di scadenza



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Numero di catalogo



Numero di lotto



Numero di materiale



Global Trade Item Number



Limite di temperatura



Produttore



Consultare le istruzioni per l'uso

## Informazioni di contatto

Per l'assistenza tecnica e per ulteriori informazioni, visitare il sito del nostro servizio di assistenza tecnica [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), chiamare lo 00800-22-44-6000 o contattare uno dei reparti del servizio tecnico QIAGEN o il distributore locale (vedere il retro di copertina o visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N° cat.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit (24)	Per 24 reazioni: Trascrittasi inversa, 5x tampone RT, miscela dNTP, primer random, inibitore RNasi, DTT, miscela master qPCR, standard di plasmidi singoli MbcR e ABL, controllo RNA altamente positivo, calibratore IS-MMR, fluorocromo ROX I, fluorocromo ROX II, miscela di primer e sonda ABL, miscela di primer e sonda gene di fusione BCR-ABL MbcR	670823
Rotor-Gene Q MDx: per analisi PCR Real-time approvata 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 funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9002033
Kit RNeasy — per la purificazione dell'RNA totale		
RNeasy Mini Kit (50)	Per 50 preparazioni di RNA: 50 colonne RNeasy Mini Spin, provette da raccolta (1,5 ml e 2 ml), reagenti e buffer privi di RNasi	74104

Prodotto	Contenuto	N° cat.
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 le informazioni aggiornate sulla licenza e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit QIAGEN specifico o il manuale utente. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza QIAGEN o al distributore locale.

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

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 declina qualsiasi responsabilità per eventuali errori contenuti 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.

Questo prodotto contiene la trascrittasi inversa SuperScript® III, che è oggetto di uno o più brevetti USA o richieste di brevetto USA, nonché di omologhe richieste di brevetto al di fuori degli USA; è di proprietà di Life Technologies Corporation; e viene venduto nell'ambito di un contratto tra Life Technologies Corporation e Ipsogen. Il prezzo di acquisto del presente prodotto include diritti limitati, non trasferibili nell'ambito dei suddetti brevetti, all'uso del quantitativo di prodotto fornito per esercitare i diritti su suddetti brevetti esclusivamente con riferimento alle attività dell'acquirente relative alla misurazione dei trascritti di BCR-ABL p210. Non vengono concessi altri diritti, neppure il diritto all'uso di questo prodotto per applicazioni in medicina forense. Per ulteriori informazioni sull'acquisizione dei diritti nell'ambito dei brevetti di proprietà di Life Technologies Corporation, rivolgersi all'ufficio licenze: Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008 (USA). (760) 603-7200. E-mail: [outlicensing@lifetech.com](mailto:outlicensing@lifetech.com).

Marchi commerciali: QIAGEN®, *ipsogen*®, RNeasy®, Rotor-Gene® (Gruppo QIAGEN); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, ROX™, SuperScript®, SYBR®, TAMRA™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Excel® (Microsoft Corporation); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); TRIZOL® (Molecular Research Center, Inc.).

#### Contratto di licenza limitato

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente dell'*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit alle seguenti condizioni:

1. L'*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit deve essere usato unicamente secondo le istruzioni contenute nell'*Manuale dell'ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit* e solo 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 dell'ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit* e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Al di là delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce nessuna garanzia che questo kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terzi.
3. Questo kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un solo utilizzo e non possono essere riutilizzati, rinnovati 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 acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo kit e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1393-003 © 2013–2016 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

---

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

