

# Manuale del kit *ipsogen*<sup>®</sup> BCR-ABL1 Mbc



Versione 1

**IVD**

Diagnostica quantitativa in vitro

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



**REF**

670123



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
GERMANIA

**R2**

**MAT**

1072507IT



## **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>
Monitoraggio della malattia	5
<b>Principio della procedura</b>	<b>8</b>
<b>Materiali in dotazione</b>	<b>11</b>
Contenuto del kit	11
<b>Materiali necessari ma non in dotazione</b>	<b>12</b>
<b>Avvertenze e precauzioni</b>	<b>13</b>
Precauzioni generali	14
<b>Conservazione e manipolazione dei reagenti</b>	<b>14</b>
<b>Procedura</b>	<b>16</b>
Preparazione dell'RNA dai campioni	16
Protocolli	
■ Trascrittasi inversa EAC standardizzata consigliata	16
■ qPCR su strumenti Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o Rotor-Gene Q 5plex HRM con rotore a 72 provette	19
■ qPCR su strumenti ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS, e LightCycler 480	23
■ qPCR su strumenti LightCycler 1.2 e 2.0	28
■ qPCR sullo strumento SmartCycler	32
<b>Interpretazione dei risultati</b>	<b>35</b>
Principio di analisi dei dati	35
Risultati	36
Guida alla risoluzione dei problemi	38
<b>Controllo qualità</b>	<b>41</b>
<b>Limiti della metodica</b>	<b>42</b>
<b>Caratteristiche delle prestazioni</b>	<b>42</b>
Studi non clinici	42
Studi clinici	45
<b>Bibliografia</b>	<b>48</b>
<b>Simboli</b>	<b>49</b>

<b>Informazioni sui contatti</b>	<b>50</b>
<b>Informazioni per gli ordini</b>	<b>51</b>

## Uso previsto

Il kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc<sub>r</sub> 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<sub>r</sub>. 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

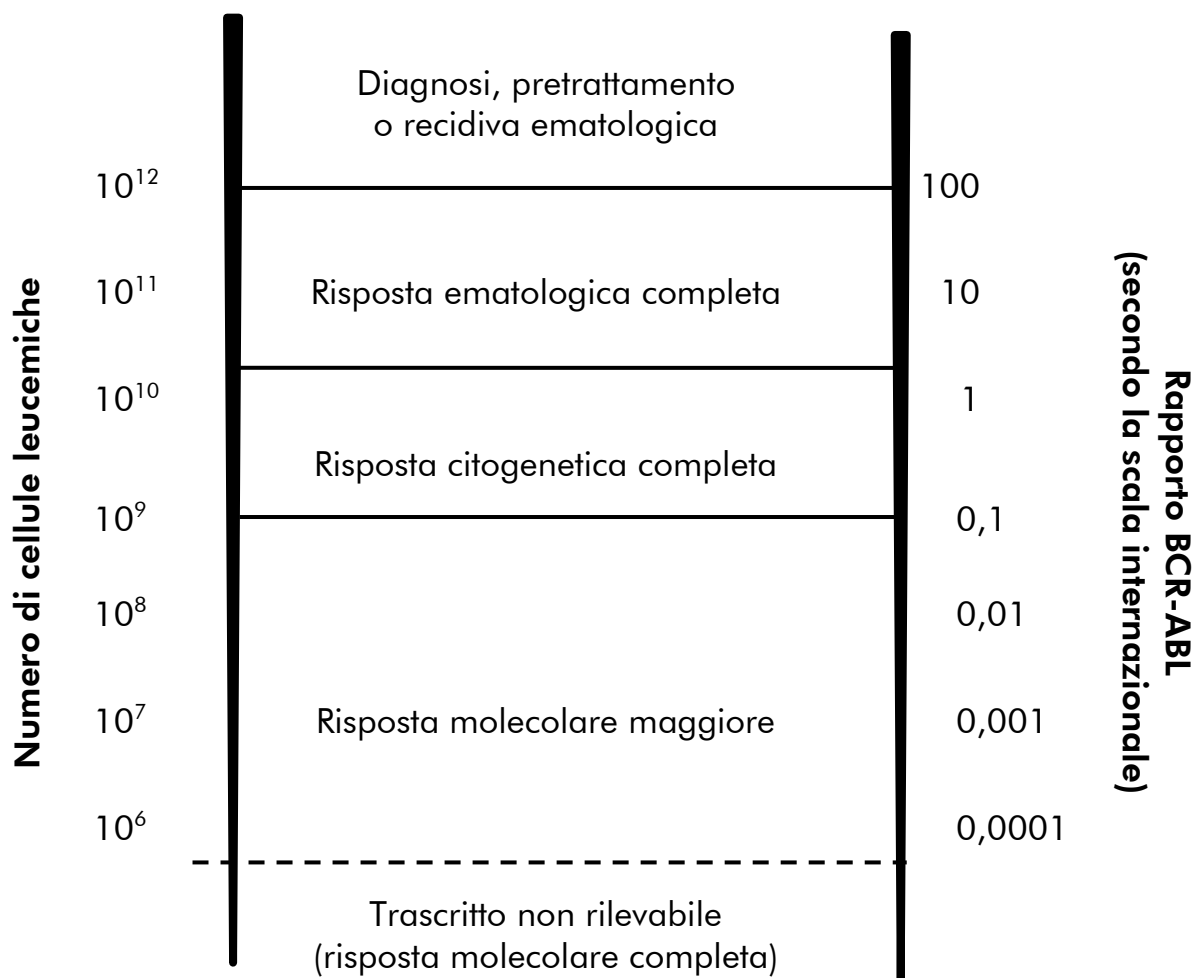
La CML appartiene al gruppo delle neoplasie mieloproliferative e in oltre il 90% dei casi è caratterizzata dalla presenza del cromosoma Philadelphia (Ph CHRS).

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 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 (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 documentazione 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).

**Tabella 1. Raccomandazioni internazionali per la gestione dei pazienti CML (adattate dal riferimento bibliografico 2)**

	<b>Risposta ematologica</b>	<b>Risposta citogenetica</b>	<b>Risposta molecolare (rapporto fra BCR-ABL e gene di controllo secondo la scala internazionale)</b>
<b>Definizioni</b>	Completa: Conta piastrinica <450 x 10 <sup>9</sup> /litro Conta leucocitaria <10 x 10 <sup>9</sup> /litro Differenziale senza granulociti immaturi e con meno del 5% di basofili Milza non palpabile	Completa: Ph+ 0% Parziale: Ph+ 1–35% Minore: Ph+ 36–65% Minima: Ph+ 66–95% Nessuna: Ph+ >95%	“Completa” indica la presenza di trascritti non quantificabili e non rilevabili Maggiore: ≤0,1
<b>Monitoraggio</b>	Controllare ogni 2 settimane finché non viene raggiunta e confermata la risposta completa, poi ogni 3 mesi salvo diversamente richiesto	Controllare almeno ogni 6 mesi finché non viene raggiunta e confermata la risposta completa, poi almeno ogni 12 mesi	Controllare ogni 3 mesi Analisi mutazionale in caso di fallimento, risposta subottimale o aumento del livello di trascritti

La risposta ematologica completa, la risposta citogenetica e la risposta molecolare devono essere confermate in due occasioni successive. La risposta citogenetica viene valutata mediante analisi citogenetica morfologica di almeno 20 metafasi del midollo osseo.

L'ibridazione in situ fluorescente (FISH) delle cellule di sangue periferico deve essere utilizzata solo in nell'impossibilità di ottenere cellule di midollo osseo. La risposta molecolare viene valutata sulle cellule di sangue periferico.

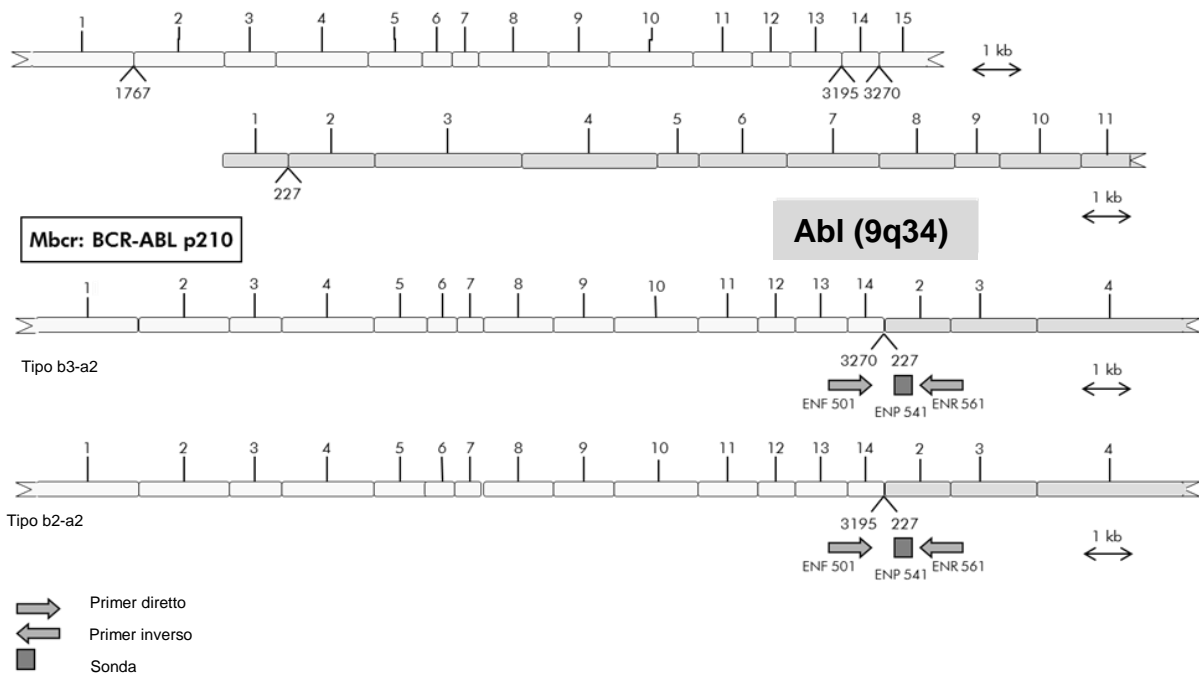
## Principio della procedura

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 (Figura 2). 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.



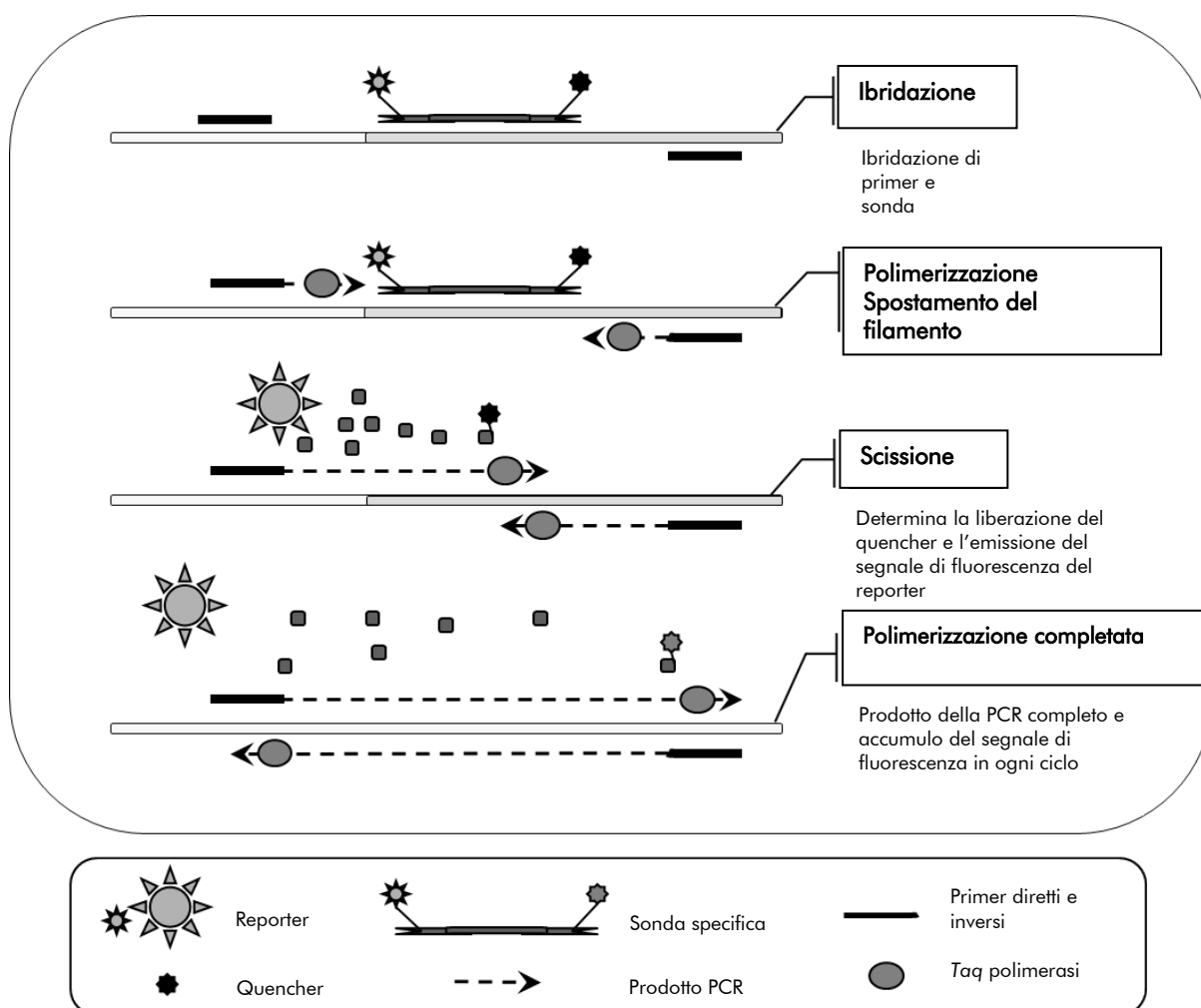
## Bcr (22q11)



**Figura 2. Rappresentazione schematica del trascritto FG BCR-ABL Mmbcr coperto dal set di primer e sonda qPCR: ENF501-ENP541-ENR561.** Il numero sotto i primer e la sonda si riferisce alla posizione del nucleotide nel trascritto genetico normale.

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 bersaglio 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 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 Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Catalogo n°</b>		<b>670123</b>
<b>Numero di reazioni</b>		<b>24</b>
ABL Control Gene Standard Dilution (diluizione standard del gene di controllo ABL) (10 <sup>3</sup> copie/5 µl)	C1-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (diluizione standard del gene di controllo ABL) (10 <sup>4</sup> copie/5 µl)	C2-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (diluizione standard del gene di controllo ABL) (10 <sup>5</sup> copie/5 µl)	C3-ABL	50 µl
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (diluizione standard del gene di fusione BCR-ABL MbcR) (10 <sup>1</sup> copie/5 µl)	F1-BCR-ABL MbcR	50 µl
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (diluizione standard del gene di fusione BCR-ABL MbcR) (10 <sup>2</sup> copie/5 µl)	F2-BCR-ABL MbcR	50 µl
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (diluizione standard del gene di fusione BCR-ABL MbcR) (10 <sup>3</sup> copie/5 µl)	F3-BCR-ABL MbcR	50 µl
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (diluizione standard del gene di fusione BCR-ABL MbcR) (10 <sup>5</sup> copie/5 µl)	F4-BCR-ABL MbcR	50 µl
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (diluizione standard del gene di fusione BCR-ABL MbcR) (10 <sup>6</sup> copie/5 µl)	F5-BCR-ABL MbcR	50 µl

<b><i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Catalogo n°</b>		<b>670123</b>
<b>Numero di reazioni</b>		<b>24</b>
Primers and Probe Mix ABL* (miscela di primer e sonda ABL)	PPC-ABL 25x	90 µl
Primers and Probe Mix BCR-ABL MbcR Fusion Gene (miscela di primer e sonda gene di fusione BCR-ABL MbcR) †	PPF-MbcR 25x	110 µl
<i>ipsogen</i> BCR-ABL MbcR Kit Handbook (inglese)		1

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

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

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

## Materiali necessari ma non in dotazione

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

### Reagenti

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

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

### Materiali di consumo

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

### Attrezzatura

- Pipetta con graduazione in microlitri\* specifica 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)
- Strumento per PCR in tempo reale:\* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o altro strumento Rotor-Gene; LightCycler 1.2, 2.0, o 480; ABI PRISM 7000, 7700, o 7900HT SDS; o strumento SmartCycler; e materiale specifico associato
- Termociclatore\* o bagnomaria\* (fase di trascrittasi inversa)

### Reagenti complementari

- Kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Controls (cat. n° 670191), costituito da linee cellulari con espressione negativa, elevata e debolmente positiva del gene di fusione BCR-ABL Mbc per la convalida qualitativa dell'estrazione dell'RNA e la trascrittasi inversa

## Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

Durante l'uso di sostanze chimiche, indossare sempre un adeguato camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per ulteriori informazioni, consultare le appropriate schede di sicurezza (SDS). Le schede SDS, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo [www.qiagen.com/safety](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 le diluizioni standard (C1–3 e F1–5) in un ambiente separato.

## Conservazione e manipolazione dei reagenti

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

- Minimizzare l'esposizione alla luce delle miscele di primer e sonda (provette PPC e PPF).

- Miscelare delicatamente e centrifugare le provette prima dell'apertura.
- Conservare tutti i componenti del kit nelle confezioni originali.

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

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

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

## Procedura

### Preparazione dell'RNA dai campioni

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

### Protocollo: Trascrittasi inversa EAC standardizzata consigliata

#### Cosa fare prima di iniziare

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

#### Procedura

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

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



**Tabella 2. Preparazione della miscela RT**

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

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

**Tabella 3. Preparazione della reazione di trascrittasi inversa**

<b>Componente</b>	<b>Volume (<math>\mu</math>l)</b>
Miscela RT	16
Campione di RNA riscaldato (1 $\mu$ g)	1–4
Acqua per PCR priva di nucleasi	0–3
Volume finale	20

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

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

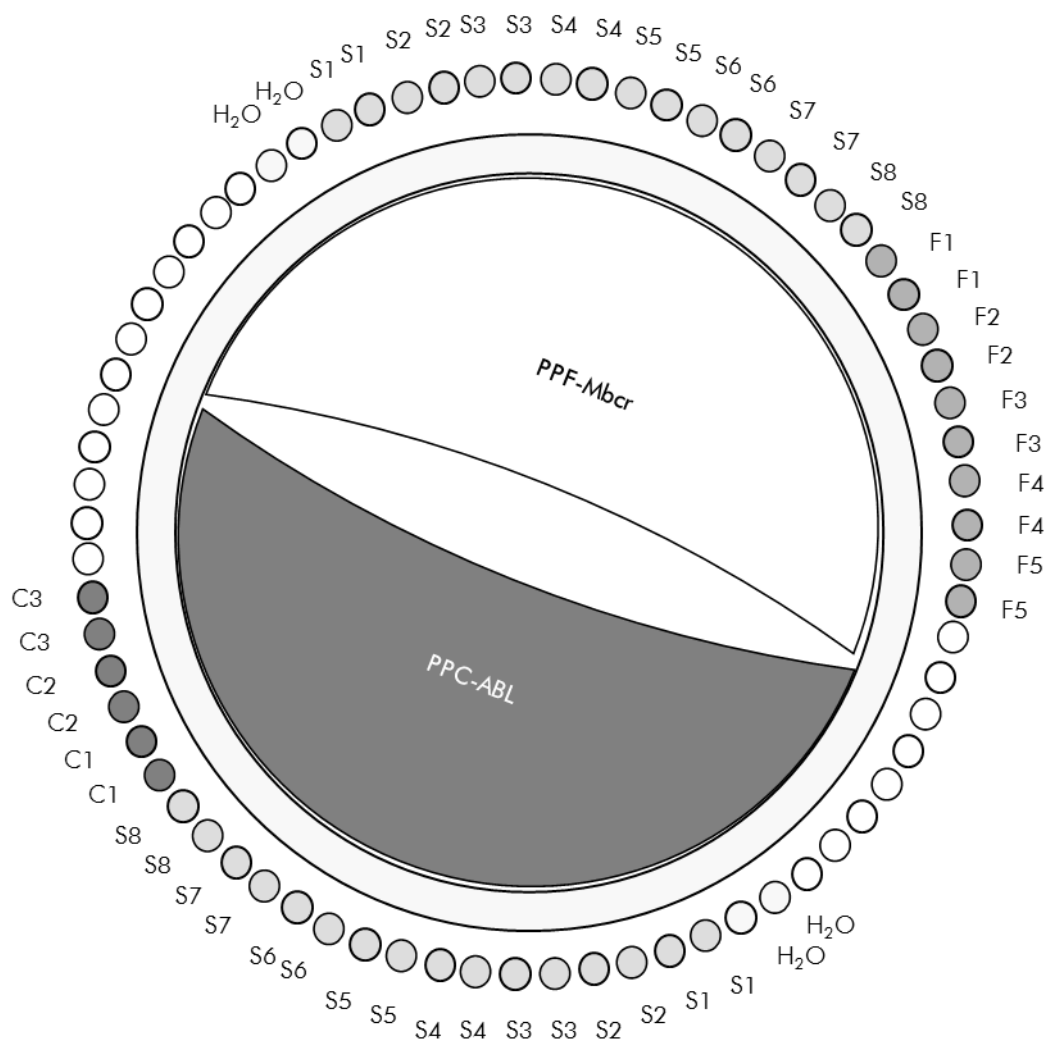
Se si utilizza uno di questi strumenti, si suggerisce di effettuare tutte le misurazioni in duplicato, come indicato nella Tabella 4.

**Tabella 4. Numero di reazioni per strumenti Rotor-Gene Q con rotore a 72-provette**

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

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

Si consiglia di effettuare il test con almeno 8 campioni di cDNA nel medesimo esperimento per ottimizzare l'utilizzo degli standard e delle miscele di primer e sonda. Ogni kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcrl contiene sufficienti reagenti per eseguire un esperimento con 8 campioni per 3 volte utilizzando il rotore a 72 provette.



**Figura 4. Configurazione consigliata del rotore per ogni esperimento con il kit *ipsogen BCR-ABL1 Mbcr*. F1–5: standard BCR-ABL Mbcr; C1–3: standard ABL; S: campione di cDNA; 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. 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 5 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 5. Preparazione della miscela qPCR**

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

- 3. Dispensare 20  $\mu$ l della premiscela qPCR in ogni provetta.**
- 4. Aggiungere 5  $\mu$ l del prodotto RT (cDNA, equivalente a 100 ng di RNA) ottenuto nella trascrittasi inversa (vedere "Protocollo: Trascrittasi inversa EAC standardizzata consigliata", pag. 16) nella provetta corrispondente (volume totale 25  $\mu$ l).**
- 5. Miscelare delicatamente aspirando e rilasciando con una pipetta.**
- 6. Posizionare le provette nel termociclatore secondo le istruzioni del produttore.**

7. Programmare lo strumento Rotor-Gene Q con il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 6.

Tabella 6. Profilo termico

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

8. Selezionare "Slope Correct" (correggi pendenza) per la fase di analisi su strumenti Rotor-Gene Q. Si consiglia di impostare la soglia a 0,03. Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 6.

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

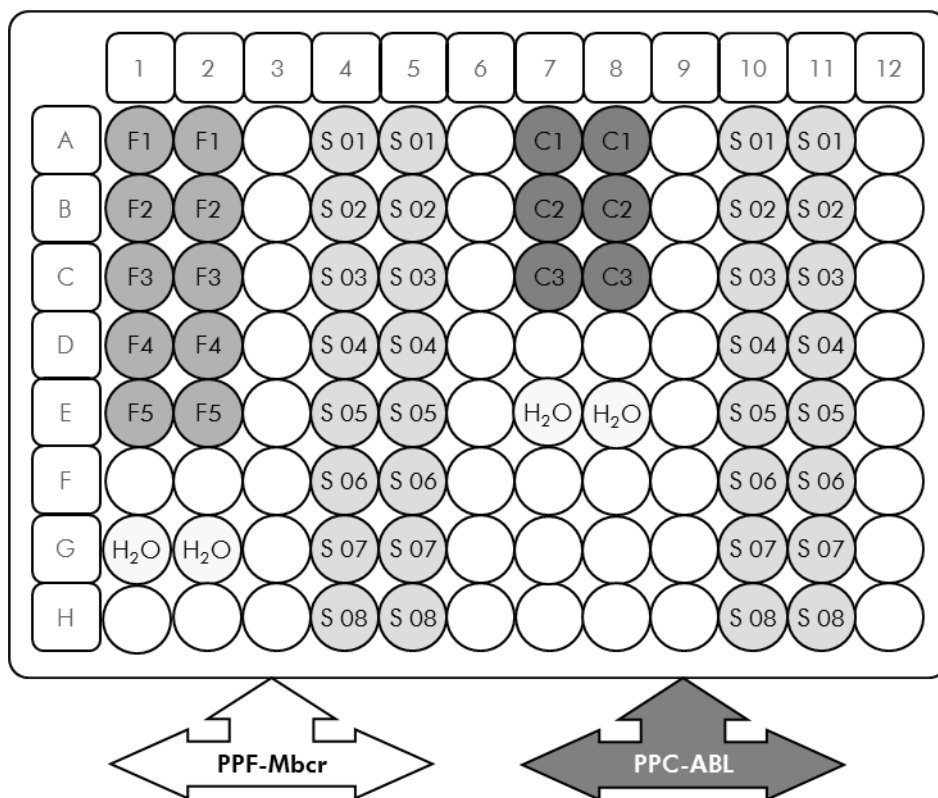
In caso di utilizzo di un dispositivo qPCR a 96 pozzetti, si suggerisce di eseguire tutte le misurazioni in duplicato, come indicato nella Tabella 7.

**Tabella 7. 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)</b>	
n campioni di cDNA	n x 2 reazioni
Standard ABL	2 x 3 reazioni (3 diluizioni, ciascuna testata in duplicato)
Acqua come materiale di controllo	2 reazioni
<b>Con la miscela di primer BCR-ABL MbcR e sonda (PPF-MbcR)</b>	
n campioni di cDNA	n x 2 reazioni
Standard MbcR	2 x 5 reazioni (5 diluizioni, ciascuna testata in duplicato)
Acqua come materiale di controllo	2 reazioni

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

Si consiglia di effettuare il test con almeno 8 campioni di cDNA nel medesimo esperimento per ottimizzare l'utilizzo degli standard e delle miscele di primer e sonda. La configurazione della piastra nella Figura 5 mostra un esempio dell'esperimento.



**Figura 5. Configurazione della piastra consigliata per un esperimento.** S: campione di cDNA; F1–5: standard BCR-ABL Mbcr; C1–3: standard ABL; H<sub>2</sub>O: acqua come materiale di controllo.

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

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

### Procedura

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

Tutte le concentrazioni sono calcolate sul volume finale di reazione.

La tabella 8 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 8. Preparazione della miscela qPCR**

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

3. **Dispensare 20  $\mu$ l della premiscela qPCR in ogni pozzetto.**
4. **Aggiungere 5  $\mu$ l del prodotto RT (cDNA, equivalente a 100 ng di RNA) ottenuto nella trascrittasi inversa (vedere "Protocollo: Trascrittasi inversa EAC standardizzata consigliata", pag. 16) nel pozzetto corrispondente (volume totale 25  $\mu$ l).**
5. **Miscelare delicatamente aspirando e rilasciando con una pipetta.**
6. **Chiudere la piastra e centrifugare brevemente (300 x g, circa 10 secondi).**
7. **Posizionare la piastra nel termociclatore secondo le istruzioni del produttore. Programmare il termociclatore con il programma di ciclizzazione termica indicato nella Tabella 9 per gli strumenti ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS, o nella Tabella 10 per lo strumento LightCycler 480.**

**Tabella 9. Profilo termico per gli strumenti ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS**

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

**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</b>	Temperatura: 50°C Durata: 2 minuti
<b>Mantenimento 2</b>	Temperatura: 95°C Durata: 10 minuti
<b>Ciclizzazione</b>	50 volte 95°C per 15 secondi 60°C per 1 minuto con acquisizione della fluorescenza FAM corrispondente a (483–533 nm) per la versione LC 01 e (465–510 nm) per la versione LC 02

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

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

**15. Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 9.**

**8b. 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 e 2.0

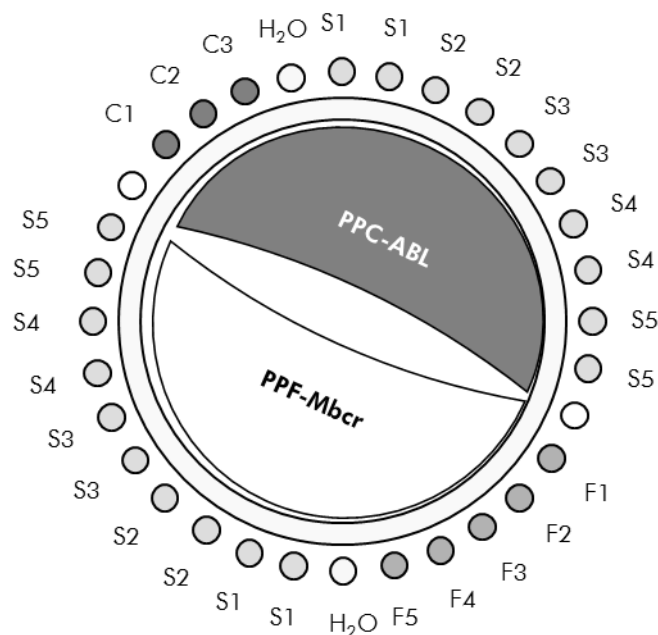
Se si utilizzano strumenti a capillari, si suggerisce di misurare i campioni in duplicato e i controlli una sola volta, come indicato nella Tabella 11.

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

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

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

Si consiglia di effettuare il test con almeno 5 campioni di cDNA nel medesimo esperimento per ottimizzare l'uso 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 Mbcr*. F1–5: standard BCR-ABL Mbcr; C1–3: standard ABL; S: campione di DNA sconosciuto da analizzare; H<sub>2</sub>O: acqua come materiale di controllo.**

### qPCR su strumenti LightCycler 1.2 e 2.0

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

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

### Procedura

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

Tutte le concentrazioni sono calcolate sul volume finale di reazione.

La tabella 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**

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

3. **Dispensare 15  $\mu$ l della premiscela qPCR in ogni capillare.**
4. **Aggiungere 5  $\mu$ l del prodotto RT (cDNA, equivalente a 100 ng di RNA) ottenuto nella trascrittasi inversa (vedere "Protocollo: Trascrittasi inversa EAC standardizzata consigliata", pag. 16) nella provetta corrispondente (volume totale 20  $\mu$ l).**
5. **Miscelare delicatamente aspirando e rilasciando con una pipetta.**
6. **Posizionare i capillari negli adattatori forniti assieme all'apparecchiatura e centrifugare brevemente (700 x g, circa 10 secondi).**
7. **Caricare i capillari nel termociclatore secondo le istruzioni del produttore.**
8. **Programmare lo strumento LightCycler 1.2 o 2.0 con il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 13.**

**Tabella 13. Profilo termico**

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

- 9. Per lo strumento LightCycler 1.2, seguire la fase 9a. Per lo strumento LightCycler 2.0, seguire la fase 9b.**
- 9a. LightCycler 1.2: Si consiglia di utilizzare la modalità F1/F2 e "2<sup>nd</sup> derivative analysis" (analisi della derivata seconda). Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 13.**
- 9b. LightCycler 2.0: Si consiglia di utilizzare l'analisi automatica (F''max) sul LightCycler 2.0 con versione software 4.0 per ottenere risultati riproducibili. Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 13.**

## Protocollo: qPCR sullo strumento SmartCycler

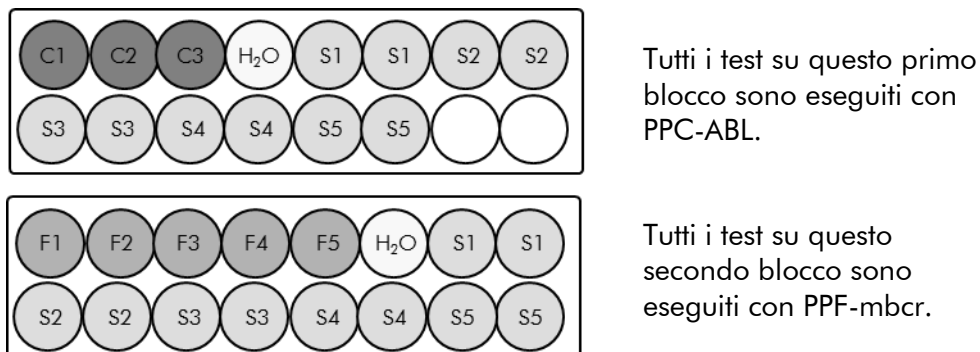
Se si utilizza questo strumento, si consiglia di analizzare i campioni in duplicato e i controlli una sola volta, come indicato nella Tabella 14.

**Tabella 14. Numero di reazioni per lo strumento SmartCycler**

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

### Processazione dei campioni sullo strumento SmartCycler

Si consiglia di effettuare il test con almeno 5 campioni di cDNA nel medesimo esperimento per ottimizzare l'utilizzo degli standard e delle miscele di primer e sonda. Lo schema a due blocchi nella Figura 7 mostra un esempio dell'esperimento.



**Figura 7. Configurazione della piastra consigliata per un esperimento.** S: campione di cDNA; F1–5: standard BCR-ABL Mbcrl; C1–3: standard ABL; H<sub>2</sub>O: acqua come materiale di controllo.



## qPCR sullo strumento SmartCycler

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

### Procedura

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

Tutte le concentrazioni sono calcolate sul volume finale di reazione.

La tabella 15 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 15. Preparazione della miscela qPCR**

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

3. **Dispensare 20  $\mu$ l della premiscela qPCR in ogni pozzetto.**
4. **Aggiungere 5  $\mu$ l del prodotto RT (cDNA, equivalente a 100 ng di RNA) ottenuto nella trascrittasi inversa (vedere "Protocollo: Trascrittasi inversa EAC standardizzata consigliata", pag. 16) nel pozzetto corrispondente (volume totale 25  $\mu$ l).**
5. **Miscelare delicatamente aspirando e rilasciando con una pipetta.**
6. **Caricare i campioni nel termociclatore secondo le istruzioni del produttore.**
7. **Programmare lo strumento SmartCycler con il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 16.**

**Tabella 16. Profilo termico**

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

8. **Si consiglia di impostare la soglia a 30. Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 16.**

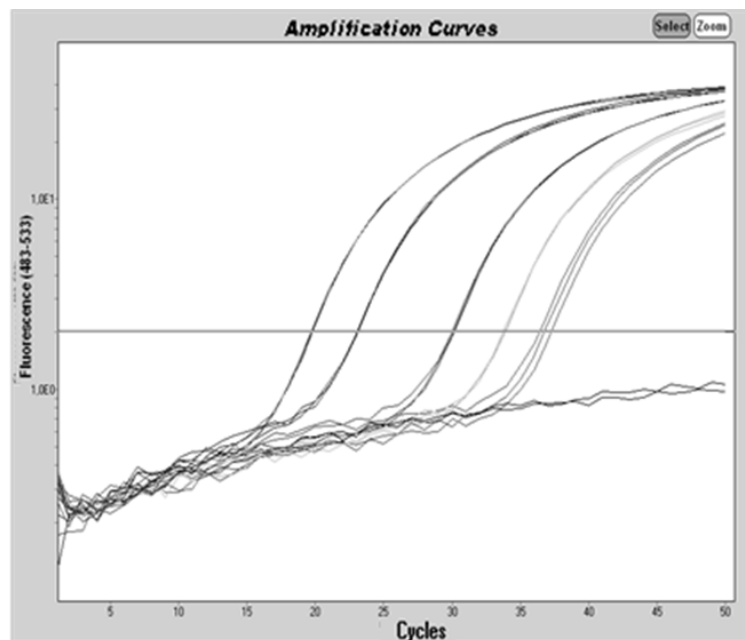
# Interpretazione dei risultati

## Principio di analisi dei dati

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

Usando campioni standard con un numero noto di molecole è possibile determinare una curva standard e stabilire la precisa quantità di materiale bersaglio presente nel campione di analisi. Le curve standard di *ipsogen* si basano su plasmidi; si utilizzano 3 diluizioni standard di plasmidi per CG e 5 diluizioni standard per FG per garantire curve standard accurate. Le Figure 8 e 9 mostrano un esempio di curve di amplificazione TaqMan ottenute con il kit *ipsogen* BCR-ABL Mbc.

- M-bcr  $10^1$
- M-bcr  $10^2$
- M-bcr  $10^3$
- M-bcr  $10^5$
- M-bcr  $10^6$



**Figura 8. Rilevazione degli standard BCR-ABL Mbc (F1–F5).**  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  copie/ $5 \mu\text{l}$ .

- ABL 10<sup>3</sup>
- ABL 10<sup>4</sup>
- ABL 10<sup>5</sup>

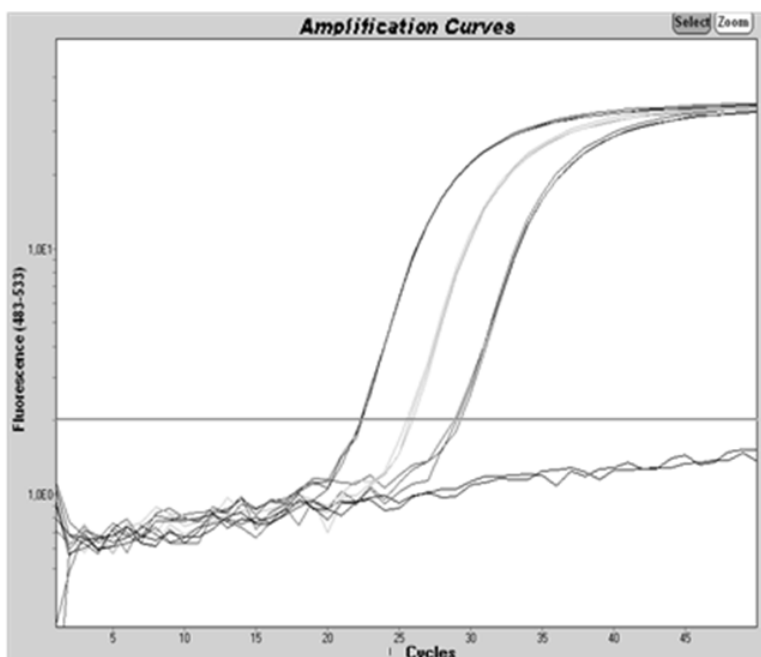


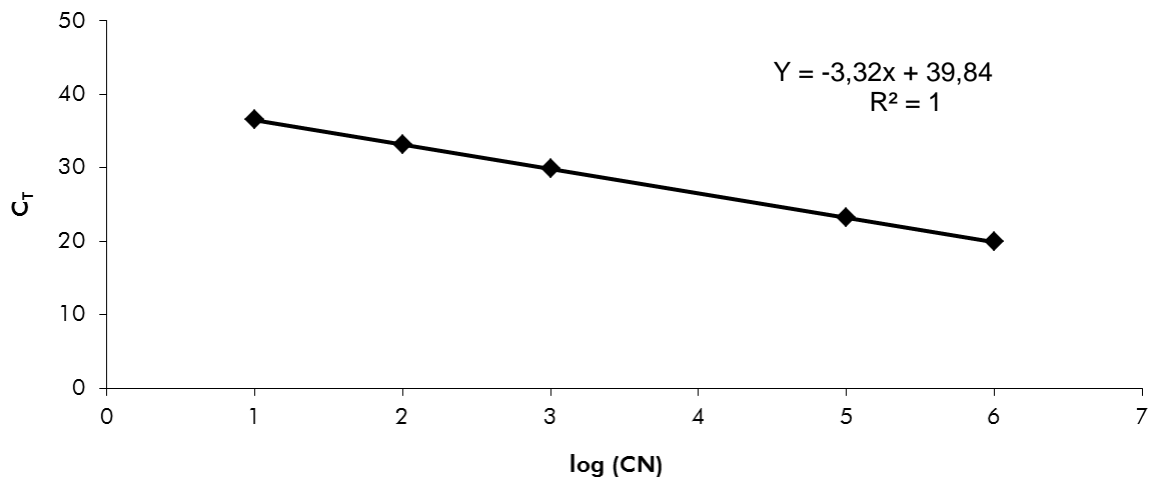
Figura 9. Rilevazione degli standard ABL (C1, C2, C3). 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> copie/5  $\mu$ l.

## Risultati

### Curva standard e criteri di qualità

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

Per ogni gene (ABL e BCR-ABL), i valori  $C_T$  non elaborati, ottenuti dalle diluizioni standard di plasmidi, vengono rappresentati su un grafico in funzione del logaritmo del numero di copie (3, 4 e 5 per C1, C2 e C3; 1, 2, 3, 5 e 6 per F1, F2, F3, F4 e F5). La Figura 10 mostra un esempio della curva teorica calcolata con 5 diluizioni standard.



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

Poiché gli standard sono stati diluiti dieci volte, la pendenza teorica della curva è  $-3,3$ . Una pendenza tra  $-3,0$  e  $-3,9$  può essere accettabile, posto che  $R^2$  sia  $>0,95$  (7). Tuttavia, per ottenere risultati precisi è auspicabile un valore di  $R^2 >0,98$  (3).

### Numero di copie normalizzato (NCN)

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

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

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

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

### Valore MRD

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

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

## Sensibilità

La sensibilità (SENS<sub>v</sub>) è il rapporto fra l'espressione relativa dell'FG alla diagnosi (FG<sub>CN</sub>/CG<sub>CN</sub>)<sub>DX</sub> e l'espressione CG (CG<sub>CN,FUP</sub>) nel campione di follow-up.

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

## Controllo qualità sui valori ABL

Una scarsa qualità dell'RNA o problemi intervenuti durante le fasi di qPCR producono un ridotto ABL<sub>CN</sub>. Si consiglia di scartare i risultati di campioni che presentano ABL<sub>CN</sub> < 4246,2 (valore inferiore dell'IC al 95% ottenuto da campioni di pazienti CML nello studio EAC, riferimento bibliografico 8).

## Riproducibilità tra replicati

La variazione dei valori C<sub>T</sub> tra i replicati deve essere < 2, il che corrisponde ad una variazione quadrupla dei valori dei numeri di copie.

La variazione dei valori C<sub>T</sub> tra i replicati è generalmente < 1,5 se il valore C<sub>T</sub> medio dei replicati è < 36 (7).

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

## Acqua come materiale di controllo

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

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

## Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per chiarire eventuali dubbi che possano presentarsi. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](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 50).

## Commenti e suggerimenti

---

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

- a) Scarsa qualità dell'RNA      Verificare sempre la qualità e la concentrazione dell'RNA prima di cominciare.  
Eeguire in parallelo un test con un controllo positivo dell'RNA della linea cellulare (kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Controls, cat. n° 670191).
- b) Errore della fase di trascrittasi inversa      Verificare sempre la qualità e la concentrazione dell'RNA prima di cominciare.  
Eeguire in parallelo un test con un controllo positivo dell'RNA della linea cellulare (kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Controls, cat. n° 670191).

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

- a) Scarsa qualità dell'RNA      Verificare sempre la qualità e la concentrazione dell'RNA prima di cominciare.  
Eeguire in parallelo un test con un controllo positivo dell'RNA della linea cellulare (kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Controls, cat. n° 670191).
- b) Errore della fase di trascrittasi inversa      Verificare sempre la qualità e la concentrazione dell'RNA prima di cominciare.  
Eeguire in parallelo un test con un controllo positivo dell'RNA della linea cellulare (kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Controls, cat. n° 670191).

### Segnale negativo dello standard

- a) Errore di pipettatura      Controllare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione.  
Ripetere la sequenza PCR.
- b) Conservazione inadeguata dei componenti del kit      Conservare il kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc a una temperatura compresa tra -15°C e -30°C e mantenere le miscele di primer e sonda (PPC e PPF) lontane dalla luce. Vedere "Conservazione e manipolazione dei reagenti", pag. 14.  
Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti.  
Conservare i reagenti in aliquote.

## Commenti e suggerimenti

---

### I controlli negativi sono positivi

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

### Nessun segnale, anche nei controlli standard

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

### Segnale assente o basso nei campioni, ma controlli standard corretti

a) Scarsa qualità o bassa concentrazione dell'RNA	Verificare sempre la qualità e la concentrazione dell'RNA prima di cominciare. Eeguire in parallelo un test con un controllo positivo dell'RNA della linea cellulare (kit <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls, cat. n° 670191).
b) Errore della fase di trascrittasi inversa	Verificare sempre la qualità e la concentrazione dell'RNA prima di cominciare. Eeguire in parallelo un test con un controllo positivo dell'RNA della linea cellulare (kit <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls, cat. n° 670191).



## Commenti e suggerimenti

---

### Intensità di fluorescenza troppo bassa

- a) Conservazione inadeguata dei componenti del kit      Conservare il kit *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR a una temperatura compresa tra -15°C e -30°C e mantenere le miscele di primer e sonda (PPC e PPF) lontane dalla luce. Vedere "Conservazione e manipolazione dei reagenti", pag. 14.  
Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti.  
Conservare i reagenti in aliquote.
- b) Quantità iniziale di RNA bersaglio molto bassa      Aumentare la quantità di RNA campione.  
**Nota:** Possono verificarsi effetti inibitori a seconda del metodo di preparazione dell'RNA selezionato.

### LightCycler: Variazioni dell'intensità di fluorescenza

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

### LightCycler: Errore della curva standard

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

## Controllo qualità

L'intero kit è stato sottoposto a controllo di qualità sullo strumento LightCycler 480. Il kit è stato prodotto in conformità con lo standard ISO 13485:2003. I certificati di analisi sono disponibili inviando una richiesta a [www.qiagen.com/support/](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) ed è conforme alle raccomandazioni internazionali aggiornate (3, 5). Il kit deve essere impiegato seguendo le istruzioni fornite nel presente manuale, assieme ai reagenti e agli strumenti convalidati (vedere "Materiali necessari ma non in dotazione", pag. 12). Qualsiasi impiego non previsto del prodotto e/o alterazione dei componenti esenteranno QIAGEN da qualsiasi responsabilità.

## Caratteristiche delle prestazioni

### Studi non clinici

#### Materiali e metodi

La valutazione delle prestazioni è stata eseguita sullo strumento ABI PRISM 7700 SDS, in combinazione con i reagenti elencati nella sezione "Materiali necessari ma non in dotazione", pag. 12. Studi di equivalenza ne hanno convalidato l'uso sui seguenti strumenti: ABI PRISM 7000 e 7900HT SDS, LightCycler 1.2 e 480, Rotor-Gene 3000 e SmartCycler (9).

Sono stati condotti studi non clinici per stabilire le prestazioni analitiche del kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc. Questi studi di laboratorio non clinici sono stati effettuati sull'RNA totale di una linea cellulare K562 diluita in una quantità finale costante di RNA totale della linea cellulare MV4-11.

Per stabilire la ripetibilità del test sono state analizzate 5 diverse concentrazioni di RNA totale di K562 (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg e 0,5 pg) diluite in RNA totale di MV4-11, in una quantità totale finale costante di 200 ng, in 5 replicati per ogni seduta di analisi e in 4 diverse sedute di analisi (Figura 11).

- K562 2.5 x 10<sup>-2</sup>
- ▣ K562 2.5 x 10<sup>-3</sup>
- K562 2.5 x 10<sup>-4</sup>
- K562 2.5 x 10<sup>-5</sup>
- K562 2.5 x 10<sup>-6</sup>

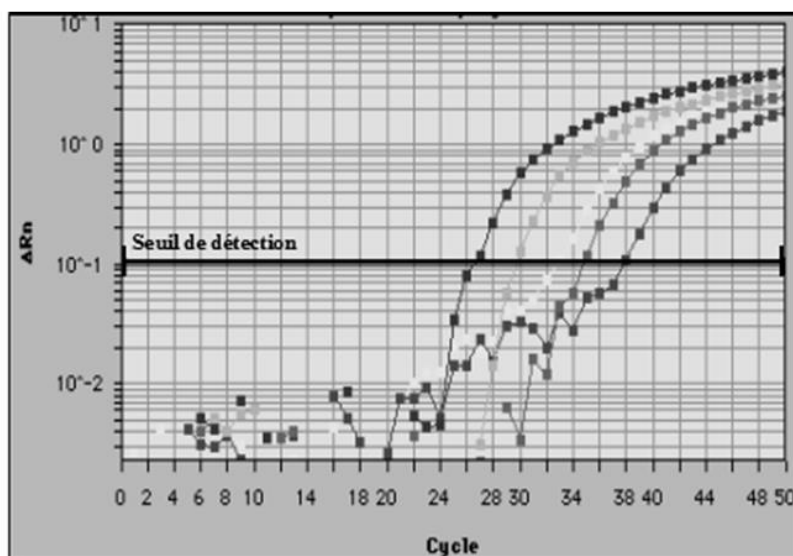


Figura 11. Grafici di amplificazione di 2,5 diluizioni da 10<sup>-2</sup> (5 ng), 2,5 da 10<sup>-4</sup> (0,05 ng), 2,5 da 10<sup>-5</sup> (0,005 ng) e 2,5 da 10<sup>-6</sup> (0,0005 ng) di RNA totale di K562 in RNA totale negativo di MV4-11.

### Dati analitici

La Tabelle 17-20 mostrano le analisi inter-test con il ciclo soglia medio (C<sub>T</sub>), la deviazione standard (DS), il numero di campioni (n), il coefficiente di variazione (CV), il numero di copie medio (CN) e il numero di copie normalizzato medio (NCN).

Tabella 17. Analisi inter-test — linee cellulari BCR-ABL Mbc e ABL

Linea cellulare	Diluizione	C <sub>T</sub> medio	DS	n	CV (%)
BCR-ABL Mbc	2,5 x 10 <sup>-2</sup> (5 ng/200 ng)	26,18	0,40	20	1,54
	2,5 x 10 <sup>-3</sup> (0,5 ng/200 ng)	29,32	0,53	19	1,82
	2,5 x 10 <sup>-4</sup> (0,05 ng/200 ng)	32,62	0,62	20	1,91
ABL	—	23,59	0,20	95	0,83

**Tabella 18. Analisi inter-test — plasmidi**

Gene	Plasmide	C <sub>T</sub> medio	DS	n	CV (%)
BCR-ABL Mbc	F1 (10 <sup>1</sup> copie)	34,47	1,25	8	3,64
	F2 (10 <sup>2</sup> copie)	31,48	0,54	8	1,71
	F3 (10 <sup>3</sup> copie)	28,17	1,11	7	3,95
	F4 (10 <sup>5</sup> copie)	21,20	0,65	8	3,06
	F5 (10 <sup>6</sup> copie)	18,22	0,09	6	0,49
ABL	C1 (10 <sup>3</sup> copie)	28,47	0,34	8	1,18
	C2 (10 <sup>4</sup> copie)	25,25	0,31	8	1,22
	C3 (10 <sup>5</sup> copie)	21,92	0,70	8	3,19

**Tabella 19. Analisi inter-test — linee cellulari BCR-ABL Mbc e ABL (CN medio)**

Linea cellulare	Diluizione	CN medio	DS	n	CV (%)
BCR-ABL Mbc	2,5 x 10 <sup>-2</sup> (5 ng/200 ng)	4.134,27	2.512,40	20	60,77
	2,5 x 10 <sup>-3</sup> (0,5 ng/200 ng)	512,8	479,51	19	93,51
	2,5 x 10 <sup>-4</sup> (0,05 ng/200 ng)	42,94	22,05	20	51,36
ABL	–	33.831,51	13.637,7	94	40,31

**Tabella 20. Analisi inter-test — linea cellulare BCR-ABL Mbc (NCN medio)**

Linea cellulare	Diluizione	NCN medio*	DS	n	CV (%)
BCR-ABL Mbc	2,5 x 10 <sup>-2</sup> (5 ng/200 ng)	12,6338	532,79	20	42,17
	2,5 x 10 <sup>-3</sup> (0,5 ng/200 ng)	1,1605	94,69	19	81,61
	2,5 x 10 <sup>-4</sup> (0,05 ng/200 ng)	0,1782	10,73	20	60,23

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

$$\frac{M_{bcr_{CN}}}{ABL_{CN}} \times 100.$$

## Studi clinici

La valutazione delle prestazioni è stata eseguita sullo strumento ABI PRISM 7700 SDS, in combinazione con i reagenti elencati nella sezione "Materiali necessari ma non in dotazione", pag. 12. Studi di equivalenza ne hanno convalidato l'uso sui seguenti strumenti: ABI PRISM 7000 e 7900HT SDS, LightCycler 1.2 e 480, Rotor-Gene 3000 e SmartCycler (9).

26 laboratori in 10 paesi europei si sono organizzati in un'azione concertata chiamata "Europe Against Cancer (EAC)" (Europa contro il cancro) e hanno utilizzato i plasmidi messi a disposizione da IPSOGEN per definire un protocollo standardizzato per l'analisi qPCR dei principali geni di fusione associati alla leucemia in strutture cliniche. Il trascritto BCR-ABL p210 è stato uno dei geni di fusione (FG) inclusi nello studio. In questa sezione presentiamo un riepilogo di questo studio di convalida; i risultati completi sono stati pubblicati (8, 10).

### Riproducibilità interlaboratorio per gli standard plasmidici CG e FG

Undici laboratori hanno eseguito un esperimento di riproducibilità interlaboratorio per valutare la variabilità della misurazione delle diluizioni standard dei plasmidi CG e FG. Le diluizioni sono state analizzate in duplicato presso ogni struttura. La Tabella 21 mostra la deviazione standard media e il CV (%) per ogni diluizione.

**Tabella 21. Riproducibilità interlaboratorio per gli standard plasmidici CG e FG**

Gene	Diluizione	Media	DS C <sub>T</sub>	CV (%)
Gene di controllo ABL	C1	29,59	1,34	4,54
	C2	26,33	1,02	3,90
	C3	22,75	1,59	6,97
Gene di fusione BCR-ABL p210	F1	41,11	2,26	5,50
	F2	37,43	1,51	4,04
	F3	33,76	1,28	3,81
	F4	26,50	1,03	3,90
	F5	22,98	0,97	4,21

## Valori di espressione del trascritto FG BCR-ABL Mbc

Le Tabelle 22 e 23 mostrano i valori di espressione del trascritto FG BCR-ABL Mbc e ABL CG, per la linea cellulare K562, per i pazienti CML e ALL alla diagnosi e i pazienti normali.

**Tabella 22. Valori di espressione del trascritto FG BCR-ABL Mbc e ABL CG — valori C<sub>T</sub>**

	Valori C <sub>T</sub> (intervallo al 95%)	
	BCR-ABL Mbc	ABL
<b>Linea cellulare K562</b>	20,5	20,7
<b>Campioni dei pazienti CML</b>		
BM (n = 15)	25,1 (21,5–27,0)	25,2 (20,7–26,8)
PB (n = 14)	23,1 (21,9–25,8)	23,7 (22,6–26,7)
<b>Campioni dei pazienti ALL</b>		
BM e PB (n = 17)	24,1 (21,5–29,9)	24,0 (21,6–26,4)
<b>Campioni negativi dei pazienti</b>		
BM (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
PB (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

**Tabella 23. Valori di espressione del trascritto FG BCR-ABL Mbcr e ABL CG — valori CN e valori del rapporto**

	Valori CN (intervallo al 95%)		Valori del rapporto (intervallo al 95%)*
	BCR-ABL Mbcr	ABL	CN BCR-ABL Mbcr/CN ABL
<b>Campioni dei pazienti CML</b>			
BM (n = 15)	8.710 (2.089–112.202)	10.115,8 (4.786,3–37.153,52)	0,86 (0,44–3,02)
PB (n = 14)	17.783 (2.042–112.202)	15.237 (4.246,2–25.568,3)	1,17 (0,48–4,41)
<b>Campioni negativi dei pazienti</b>			
BM (n = 26)	–	19.201 (12.922–25.480)	–
PB (n = 74)	–	21.136 (17.834–24.437)	–

\* I risultati sono espressi come semplici rapporti BCR-ABL/ABL.

I valori C<sub>T</sub> ABL non presentano differenze significative fra i campioni normali e leucemici, né fra i tipi di campioni (PB o BM) o i campioni di leucemia (ALL, AML, CML).

### Quote di falsi positivi e falsi negativi

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

- Controlli positivi: cellule K562, una linea cellulare ben nota per la sua positività per il gene di fusione BCR-ABL p210; campioni di pazienti già valutati per la positività p210
- Controlli negativi: campioni di RNA negativi, controlli di assenza di amplificazione (NAC), costituiti da RNA di *E. coli* invece che RNA umano per controllare la presenza di contaminazione della PCR, e controlli no template (NTC) contenenti acqua al posto di RNA umano

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

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

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

La Tabella 24 mostra il numero e la percentuale di campioni falsi negativi e falsi positivi.

**Tabella 24. Campioni falsi negativi e falsi positivi**

Falsa negatività		Falsa positività	
$10^{-3}$	$10^{-4}$	Controllo negativo FG	NAC/NTC
0% (0/33)	6,1% (2/33)	10,9% (6/55)	4,1% (14/340)

## Bibliografia

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

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

## Riferimenti citati

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. Silvy, M., Mancini, J., Thirion, X., Sigaux, F., and Gabert, J. (2005) Evaluation of real-time quantitative PCR machines for the monitoring of fusion gene transcripts using the Europe against cancer protocol. *Leukemia* **19**, 305.
10. 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 Mbc Kit (24)	Per 24 reazioni: standard del gene di controllo ABL, standard del gene di fusione BCR-ABL Mbc, miscela di primer e sonda ABL, miscela di primer e sonda gene di fusione BCR-ABL Mbc	670123
<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> BCR-ABL1 Mbc Controls — per la convalida qualitativa dell'estrazione dell'RNA e la trascrittasi inversa del gene di fusione BCR-ABL Mbc</b>		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls Kit	Linee cellulari con espressione negativa, elevata e debolmente positiva del gene di fusione BCR-ABL Mbc	670191

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i discoli 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.

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Questa pagina è stata lasciata in bianco 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 non si assume responsabilità per errori eventualmente riscontrati in questo documento. Questo documento è considerato completo e accurato al momento della pubblicazione. In nessun caso QIAGEN potrà essere ritenuta responsabile di danni accidentali, particolari, multipli o secondari in relazione all'impiego di questo documento o derivanti da quest'ultimo.

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

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

### **Contratto di Licenza Limitato**

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

1. Il kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc deve essere usato unicamente secondo le istruzioni contenute nel *Manuale del kit ipsogen BCR-ABL1 Mbc* e in combinazione con i componenti contenuti nel kit. QIAGEN non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, per l'uso o l'aggiunta dei componenti del kit ad altri componenti non contenuti nel kit, ad eccezione di quanto descritto nel *Manuale del kit ipsogen BCR-ABL1 Mbc* e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://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](http://www.qiagen.com).

HB-1360-002 © 2013–2015 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

---

**www.qiagen.com**

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

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

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

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

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

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

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

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

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

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

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

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

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

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

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

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

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

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

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

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

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

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

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

**USA** ■ techservice-us@qiagen.com

