

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

Σ 52

Versione 1

IVD

Diagnostica quantitativa in vitro

Da utilizzare con gli strumenti Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, ABI PRISM<sup>®</sup> 7000, 7700 o 7900HT SDS, Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Real-Time PCR, LightCycler<sup>®</sup>, e SmartCycler<sup>®</sup>



REF

670125



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
GERMANIA

R2

MAT

1072508IT



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN è un fornitore leader nel settore delle tecnologie innovative per campioni e analisi che consentono di isolare e rilevare il contenuto di qualunque 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 spiegazione</b>	<b>5</b>
Monitoraggio della malattia	5
<b>Principio della procedura</b>	<b>9</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>15</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 ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS, sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR e strumento 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 di qualità</b>	<b>41</b>
<b>Limitazioni</b>	<b>41</b>
<b>Caratteristiche delle prestazioni</b>	<b>42</b>
Studi non clinici	42
Studi clinici	45
<b>Bibliografia</b>	<b>49</b>
<b>Simboli</b>	<b>50</b>

<b>Informazioni sui contatti</b>	<b>51</b>
<b>Informazioni per gli ordini</b>	<b>52</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 (Bone Marrow (BM)) o sangue periferico (peripheral blood (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 spiegazione

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

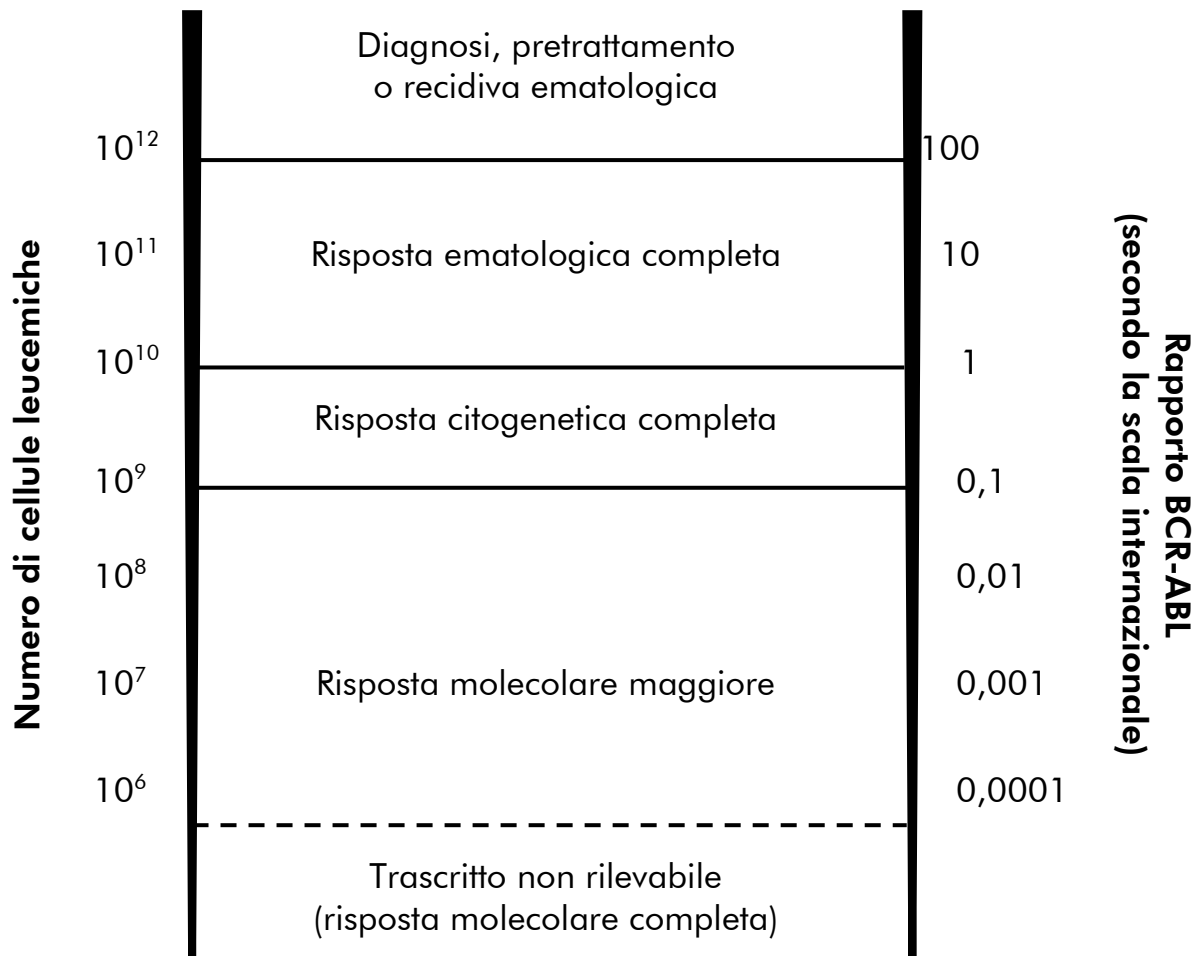
Questo cromosoma è il risultato di una traslocazione reciproca fra i bracci lunghi dei cromosomi 9 e 22, t(9;22): la BCR, ossia la regione di raggruppamento dei punti di rottura, è localizzata sul cromosoma 22, mentre l'oncogene c-ABL si trova sul cromosoma 9. Il corrispondente gene di fusione, BCR-ABL, 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 determinazione dei trascritti BCR-ABL Mbc (3-5). Inoltre, è stato recentemente convalidato un pool di riferimento sotto l'egida dell'OMS per consentire una semplice standardizzazione della quantificazione dei trascritti BCR-ABL (6).

**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 nell'impossibilità di ottenere cellule di midollo osseo. La risposta molecolare viene valutata sulle cellule di sangue periferico.



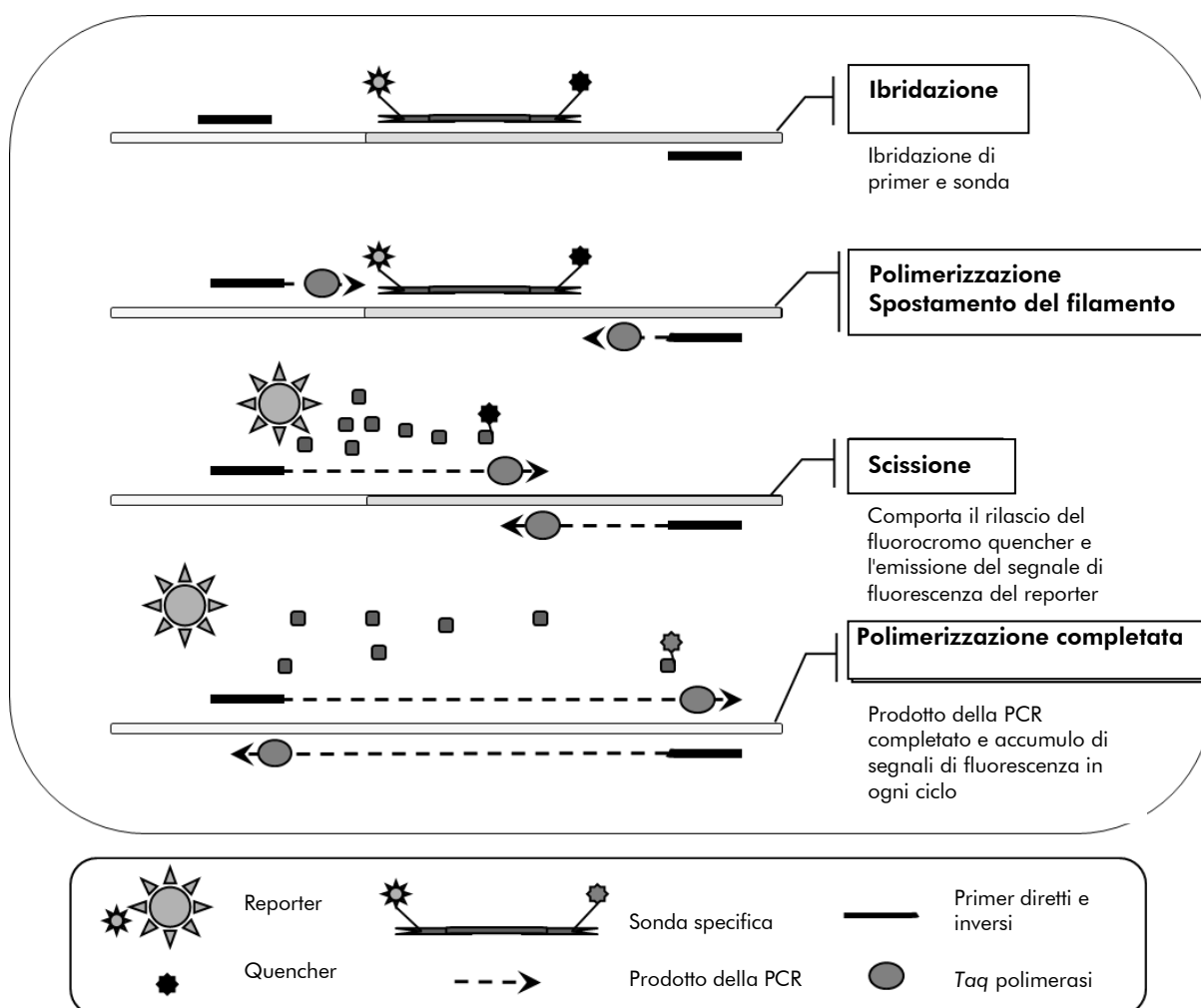
## Principio della procedura

La tecnica di 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 Dye, analisi qPCR tramite sonde idrolitiche e analisi qPCR tramite sonde di ibridazione.

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

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

L'aumento del segnale di fluorescenza è rilevato solo se la sequenza 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 del bersaglio durante la PCR.



**Figure 2. Principio della reazione.** L'RNA totale viene retrotrascritto e il cDNA generato viene amplificato mediante PCR per mezzo di una coppia di primer specifici e di una sonda interna specifica a doppio fluorocromo (FAM™–TAMRA™). La sonda si lega all'amplicone durante ogni fase di ibridazione della PCR. Estendendosi dal legame del primer all'amplicone, la Taq DNA polimerasi allontana l'estremità 5' della sonda, che viene poi degradata dall'attività esonucleasica 5'→3' della Taq DNA polimerasi. La scissione continua finché la sonda residua non si lega all'amplicone. Questo processo libera in soluzione il fluoroforo e il quencher, separandoli e determinando un aumento di fluorescenza dal FAM e una diminuzione di fluorescenza dal TAMRA.

## Materiali in dotazione

### Contenuto del kit

<b>ipsogen BCR-ABL1 MbcR Kit</b>		<b>(52)</b>
<b>Catalogo n°</b>		<b>670125</b>
<b>Numero di reazioni</b>		<b>52</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>(52)</b>
<b>Catalogo n°</b>		<b>670125</b>
<b>Numero di reazioni</b>		<b>52</b>
Due flaconcini di Primers and Probe Mix ABL (miscela di primer e sonda ABL)*	PPC-ABL 25x	2 x 90 µl
Due flaconcini di Primers and Probe Mix BCR-ABL MbcR Fusion Gene (miscela di primer e sonda gene di fusione BCR-ABL MbcR)†	PPF-BCR-ABL MbcR 25x	2 x 110 µl
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR Kit Handbook (manuale del kit <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR) (inglese)		1

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

† Miscela di primer inversi e diretti specifici per il gene di fusione (FG) 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 (trascrittasi inversa Superscript II o Superscript), 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<sup>®</sup> 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; 100-1.000  $\mu$ 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)
- Strumenti per PCR in tempo reale:\* Rotor-Gene Q 5plex HRM o altro strumento Rotor-Gene; LightCycler 1.2, 2.0 o 480; ABI PRISM 7000, 7700 o 7900HT SDS; sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR; o SmartCycler; e materiale specifico associato
- Termociclatore\* o bagnomaria\* (fase di trascrittasi inversa)

### Reagenti complementari

- Kit *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR Controls (cat. n° 670191), costituito da linee cellulari con espressione negativa, elevata e debolmente positiva del gene di fusione BCR-ABL MbcR 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.

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

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

## Precauzioni generali

Per utilizzare 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  $-30^{\circ}\text{C}$  e  $-15^{\circ}\text{C}$  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 del componente. 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°C.
- Preparare un esometro qualsiasi, 100 µM. Conservare in aliquote a -20°C.
- Preparare il MgCl<sub>2</sub>, 50 mM. Conservare in aliquote a -20°C.

#### Procedura

1. **Scongelare tutti i componenti necessari e collocarli su ghiaccio.**
2. **Incubare 1 µg di RNA (1–4 µl) per 10 minuti a 70°C e raffreddare immediatamente su ghiaccio per 5 minuti.**
3. **Centrifugare brevemente (circa 10 secondi a 10.000 giri/min, per raccogliere il liquido sul fondo della provetta), poi conservare su ghiaccio.**
4. **Preparare la seguente miscela RT a seconda del numero di campioni da analizzare (Tabella 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 o Superscript Reverse Transcriptase (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. Dispensare 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. 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 5 minuti per arrestare la reazione.**
- 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 e sonda ABL (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 e sonda BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc)</b>	
n campioni di cDNA	n x 2 reazioni
Standard Mbc	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 13 campioni di cDNA nel medesimo esperimento per ottimizzare l'utilizzo degli standard e delle miscele di primer e sonda.



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: 34 + 1 reazioni (<math>\mu</math>l)</b>	<b>BCR-ABL Mbcr: 38 +1 reazioni (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentrazione finale</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	437,5	487,5	1x
Miscela di primer e sonda, 25x	1	35	39	1x
Acqua per PCR priva di nucleasi	6,5	227,5	253,3	–
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: singola

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 ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS, sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR e strumento LightCycler 480

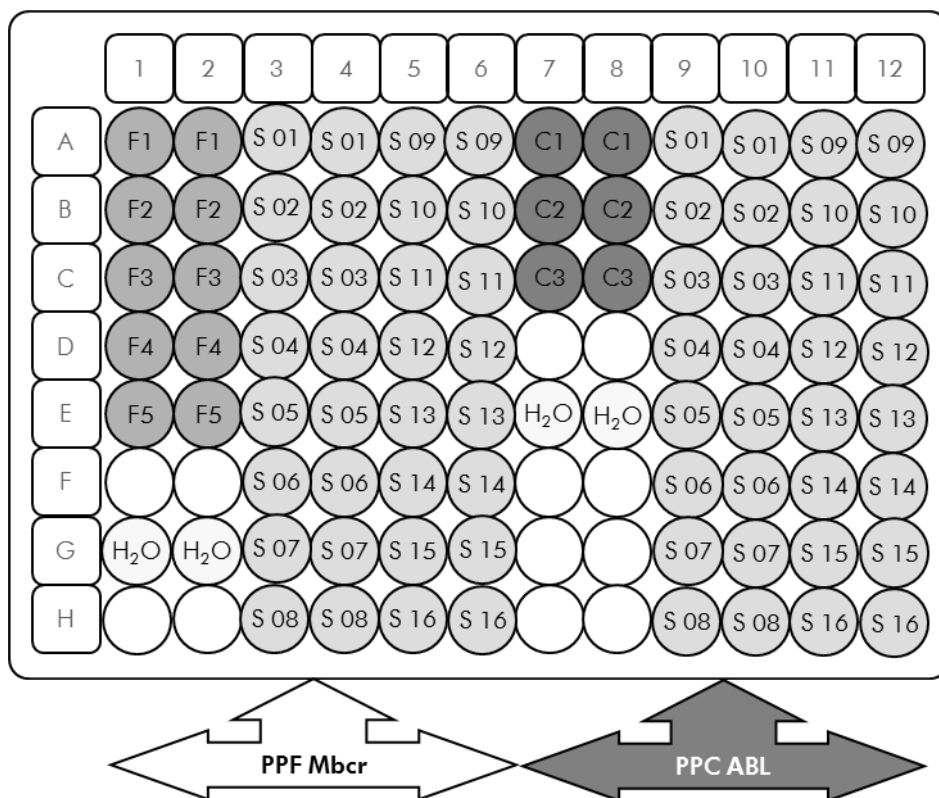
In caso di utilizzo di un dispositivo qPCR a 96 pozzetti, si suggerisce di eseguire tutte le misurazioni in duplicato, come indicato nella Tabella 7.

**Tabella 7. Numero di reazioni utilizzando un dispositivo qPCR a 96 pozzetti**

<b>Campioni</b>	<b>Reazioni</b>
<b>Con la miscela di primer e sonda ABL (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 e sonda BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc)</b>	
n campioni di cDNA	n x 2 reazioni
Standard Mbc	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, sistema Applied Biosystems Real-Time PCR e LightCycler 480

Si consiglia di effettuare il test con almeno 16 campioni di cDNA nel medesimo esperimento per ottimizzare l'utilizzo degli standard e delle miscele di primer e sonda. La configurazione della piastra nella Figura 4 mostra un esempio dell'esperimento.



**Figura 4. Configurazione della piastra consigliata per un esperimento.** S: campione di cDNA; F1–5: standard BCR-ABL MbcR; C1–3: standard ABL; H<sub>2</sub>O: acqua come materiale di controllo.

### qPCR su strumenti ABI PRISM 7000, 7700 e 7900 SDS, sistema Applied Biosystems Real-Time PCR 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.**

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: 40 + 1 reazioni (<math>\mu</math>l)</b>	<b>BCR-ABL Mbc: 44 + 1 reazioni (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentrazione finale</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	512,5	562,5	1x
Miscela di primer e sonda, 25x	1	41	45	1x
Acqua per PCR priva di nucleasi	6,5	266,5	292,5	–
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 ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS o il sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, o nella Tabella 10 per lo strumento LightCycler 480.**

**Tabella 9. Profilo termico per ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS o il sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR**

<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 ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS o il sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, seguire la fase 8a. Per lo strumento LightCycler 480, seguire la fase 8b.**

**8a. ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS o sistema Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR: 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

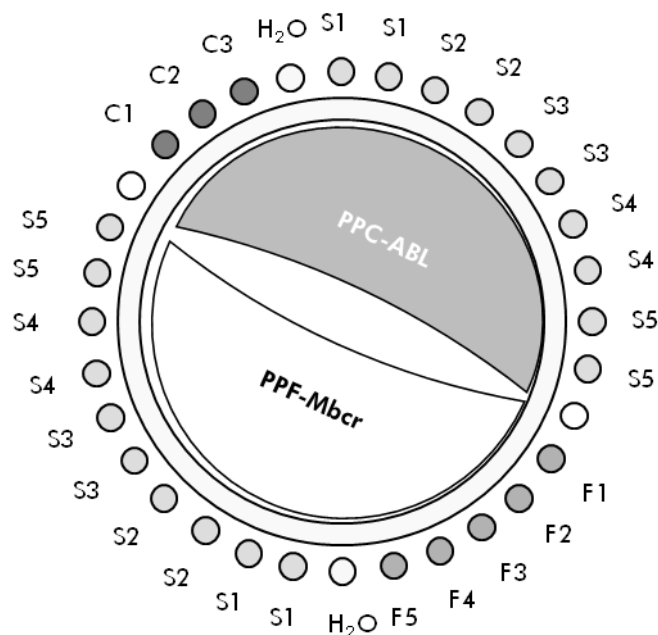
Se si utilizzano strumenti a capillari, si suggerisce di misurare i campioni in duplicato e i controlli una sola volta, come indicato nella Tabella 11.

**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 e sonda ABL (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 e sonda BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc)</b>	
n campioni di cDNA	n x 2 reazioni
Standard Mbc	1 x 5 reazioni (5 diluizioni standard, ciascuna testata una sola volta)
Acqua come materiale di controllo	1 reazione

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

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



**Figura 5. Configurazione consigliata del rotore per ogni esperimento con il kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr.** F1–5: standard BCR-ABL Mbcr; C1–3: standard ABL; S: campione di DNA sconosciuto da analizzare; 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 miscele di reazione LightCycler TaqMan Master e di attenersi alle istruzioni del produttore per la preparazione della miscela master 5x.

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

### Procedura

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

Tutte le concentrazioni sono calcolate sul volume finale di reazione.

La Tabella 12 mostra lo schema di pipettatura per la preparazione di una miscela di reagenti, calcolata per ottenere un volume di reazione finale di 20 µl. 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	5 ciascuno	5 ciascuno	–
Volume totale	20	20 ciascuno	20 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 gli strumenti 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: singola
<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 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.**

## Protocollo: qPCR sullo strumento SmartCycler

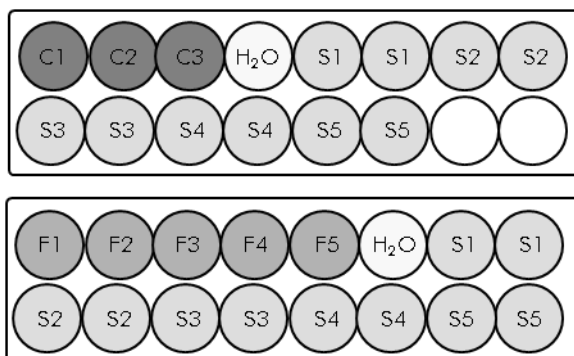
Se si utilizza questo strumento, si consiglia di analizzare i campioni in duplicato e i controlli una sola volta, come indicato nella Tabella 14.

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

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

### Processazione dei campioni sullo strumento SmartCycler

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



Tutti i test su questo primo blocco sono eseguiti con PPC-ABL.

Tutti i test su questo secondo blocco sono eseguiti con PPF-Mbc.

**Figura 6. Configurazione della piastra consigliata per un esperimento.** S: campione di cDNA; F1–5: standard BCR-ABL Mbc; 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) nella provetta 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: singola

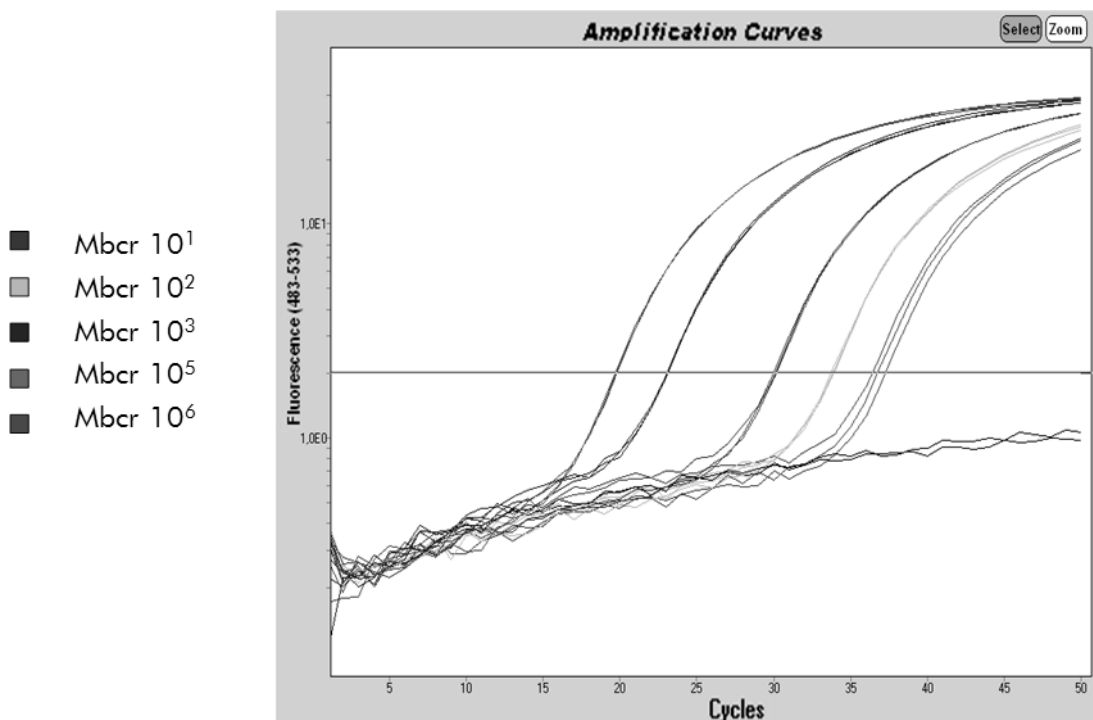
8. **Si consiglia di impostare la soglia a 30. Avviare il programma di ciclizzazione termica come indicato nella Tabella 16.**

# 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 il numero preciso di target presenti nel campione di prova. Le curve standard di *ipsogen* si basano su plasmidi; per garantire curve standard accurate si utilizzano 3 diluizioni standard di plasmidi per il gene di controllo (CG) ABL e 5 diluizioni standard per il gene di fusione (FG). Le Figure 7 e 8 mostrano un esempio di curve di amplificazione TaqMan ottenute con il kit *ipsogen* BCR-ABL Mbc.



**Figura 7. Rilevazione degli standard BCR-ABL Mbc (F1-F5). 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> copie/5  $\mu$ l.**

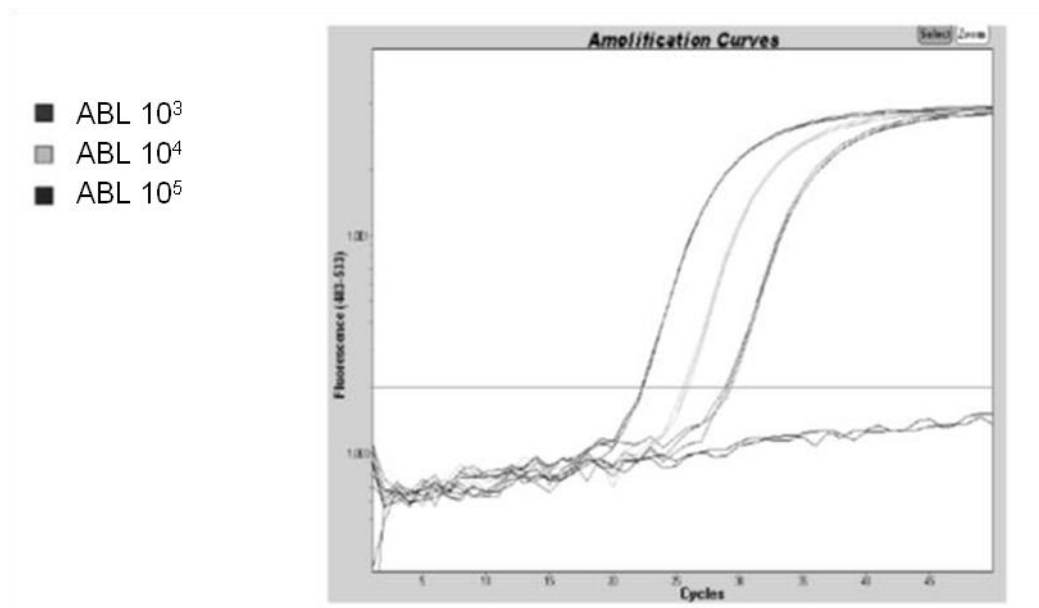


Figura 8. Rilevazione degli standard ABL (C1, C2, C3). 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> copie/5 µl.

## 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<sub>T</sub> non elaborati, ottenuti dalle diluizioni standard di plasmidi, vengono rappresentati su un grafico in funzione del logaritmo del numero di copie (3, 4 e 5 per C1, C2 e C3; 1, 2, 3, 5 e 6 per F1, F2, F3, F4 e F5). La Figura 9 mostra un esempio della curva teorica calcolata con 5 diluizioni standard.

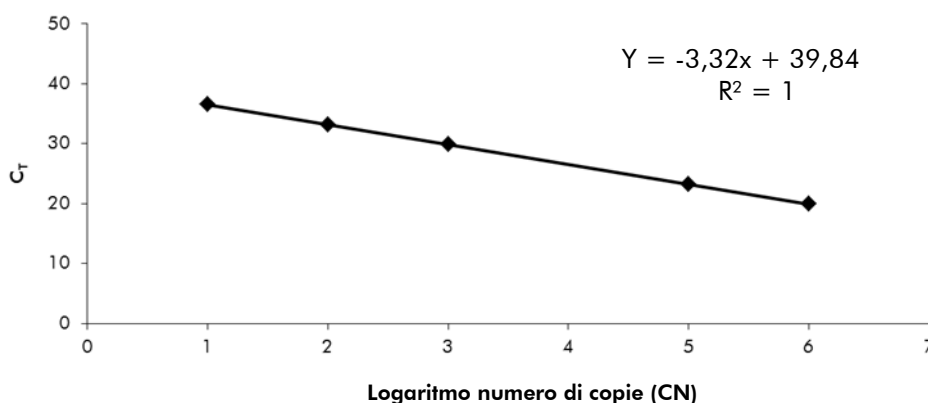


Figura 9. Curva teorica calcolata con 5 diluizioni standard. Si calcola una curva di regressione lineare ( $y = ax + b$ ) per ogni gene (ABL e BCR-ABL), dove  $a$  è la pendenza della linea e  $b$  è l'intercetta  $y$ , ossia la coordinata  $y$  del punto in cui la linea attraversa l'asse  $y$ . La relativa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

Poiché gli standard sono stati diluiti 10 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 per PPC-ABL) dei campioni sconosciuti in numeri di copie ABL ( $ABL_{CN}$ ).

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

Dal rapporto fra questi valori CN si ottiene il numero di copie normalizzato (NCN):

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

### Valore MRD

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

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

### Sensibilità

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

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

### Controllo qualità sui valori ABL

Una scarsa qualità dell'RNA o problemi intervenuti durante le fasi di qPCR producono un ridotto  $ABL_{CN}$ . Si consiglia di scartare i risultati di campioni che presentano  $ABL_{CN} < 4.246,2$  (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  $C_T$  tra i replicati deve essere  $<2$ , il che corrisponde ad una variazione quadrupla dei valori dei numeri di copie.

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

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

## 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 analisi (per le informazioni sui contatti, consultare "Informazioni sui contatti", pag. 51).

### 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.<br><br>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.<br><br>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

---

### 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. 15.  
Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti.  
Conservare i reagenti in aliquote.

### I controlli negativi sono positivi

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

## Commenti e suggerimenti

---

### Nessun segnale, anche nei controlli standard

- |  |  |
|--|--|
| a) Errore di pipettatura o reagenti mancanti                                       | Controllare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione.<br>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.<br>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.<br>Eseguire 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.<br>Eseguire in parallelo un test con un controllo positivo dell'RNA della linea cellulare (kit <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls, cat. n° 670191). |

### Intensità di fluorescenza troppo bassa

- |  |   |
|--|---|
| a) Conservazione inadeguata dei componenti del kit | Conservare il kit <i>ipsogen</i> 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. 15.<br>Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti.<br>Conservare i reagenti in aliquote. |
|--|---|



## Commenti e suggerimenti

---

- 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 di 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/).

## Limitazioni

Gli utilizzatori del kit devono essere adeguatamente formati e avere acquisito dimestichezza con questa tecnica prima di iniziare a usare il dispositivo. Il kit deve essere impiegato seguendo le istruzioni fornite nel presente manuale, assieme agli strumenti approvati indicati in "Materiali necessari ma non in dotazione", pag. 12.

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.

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 “Europa contro il cancro” (Europe Against Cancer (EAC)) (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. Qualsiasi impiego non previsto del prodotto e/o alterazione dei componenti esenteranno QIAGEN da qualsiasi responsabilità.

## Caratteristiche delle prestazioni

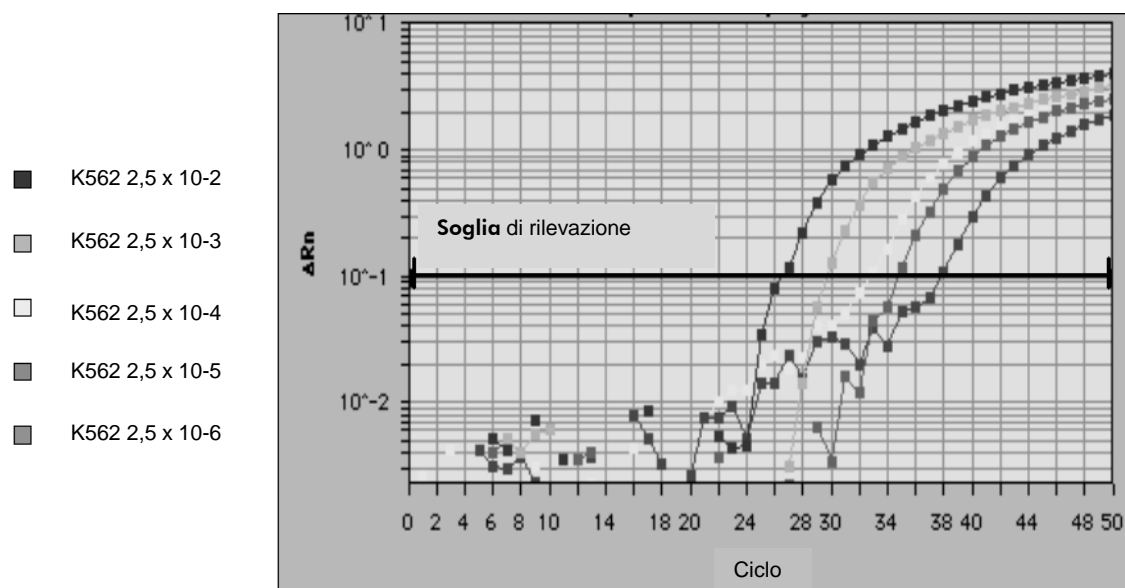
### Studi non clinici

#### 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 Mbcr. 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 10).



**Figura 10. Grafici di amplificazione di  $2,5 \times 10^{-2}$  (5 ng),  $2,5 \times 10^{-3}$  (0,5 ng),  $2,5 \times 10^{-4}$  (0,05 ng),  $2,5 \times 10^{-5}$  (0,005 ng) e  $2,5 \times 10^{-6}$  (0,0005 ng) diluizioni di RNA totale di K562 in RNA totale negativo di MV4-11.**

### Dati analitici

Le Tabelle 17-20 mostrano le analisi inter-test con il ciclo soglia medio ( $C_T$ ), la deviazione standard (DS), il numero di campioni (n), il coefficiente di variazione (CV), il numero di copie medio (CN) e il numero di copie normalizzato medio (NCN).

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

Linea cellulare	Diluizione	$C_T$ medio	DS	n	CV (%)
BCR-ABL Mbc	$2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng/200 ng)	26,18	0,40	20	1,54
	$2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng/200 ng)	29,32	0,53	19	1,82
	$2,5 \times 10^{-4}$ (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 BCR-ABL Mbcr e ABL**

Gene	Plasmide	C <sub>T</sub> medio	DS	n	CV (%)
BCR-ABL Mbcr	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 Mbcr e ABL (CN medio)**

Linea cellulare	Diluizione	CN medio	DS	n	CV (%)
BCR-ABL Mbcr	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)	512,80	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	–	3.3831,51	13.637,70	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	$2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng/200 ng)	12,6338	532,79	20	42,17
	$2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng/200 ng)	1,1605	94,69	19	81,61
	$2,5 \times 10^{-4}$ (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  $\frac{\text{Mbc CN}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 100$

## 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 "Europa contro il cancro" (Europe Against Cancer (EAC)) (1) e hanno utilizzato i plasmidi messi a disposizione da IPSOGEN per definire un protocollo standardizzato per l'analisi qPCR dei principali geni di fusione (FG) 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 nel 2003 (8, 10).

## Riproducibilità interlaboratorio per gli standard plasmidici CG e FG

11 laboratori in totale 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**

<b>Gene</b>	<b>Diluizione</b>	<b>Media</b>	<b>DS C<sub>T</sub></b>	<b>CV (%)</b>
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
FG BCR-ABL Mbc <sub>r</sub> 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<sub>r</sub>**

Le Tabelle 22 e 23 mostrano i valori di espressione del trascritto FG BCR-ABL Mbc<sub>r</sub> e del CG ABL, per la linea cellulare K562, per i pazienti CML e ALL alla diagnosi rispetto ai pazienti con controllo negativo.

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

	Valori C <sub>T</sub> (intervallo al 95%)	
	BCR-ABL Mbcr	ABL
<b>Linea cellulare K562</b>	20.5	20.7
<b>Campioni dei pazienti CML</b>		
Midollo osseo (n = 15)	25,1 (21,5-27,0)	25,2 (20,7-26,8)
Sangue periferico (n = 14)	23,1 (21,9-25,8)	23,7 (22,6-26,7)
<b>Campioni dei pazienti ALL</b>		
Midollo osseo e sangue periferico (n = 17)	24,1 (21,5-29,9)	24,0 (21,6-26,4)
<b>Campioni negativi dei pazienti</b>		
Midollo osseo (n = 26)	–	25,35 (24,68-26,02)
Sangue periferico (n = 74)	–	25,15 (24,83-25,48)

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

**Tabella 23. Valori di espressione del trascritto FG BCR-ABL Mbc r e del CG ABL — valori CN e NCN**

	Valori CN (intervallo al 95%)		Valori NCN (intervallo al 95%)
	BCR-ABL Mbc r	ABL	CN BCR-ABL Mbc r/CN ABL
<b>Campioni dei pazienti CML</b>			
Midollo osseo (n = 15)	8.710 (2089-112.202)	10.115,8 (4786,3- 37.153,52)	0,86 (0,44-3,02)
Sangue periferico (n = 14)	17.783 (2042-112.202)	15.237 (4246,2-25.568,3)	1,17 (0,48-4,41)
<b>Campioni negativi dei pazienti</b>			
Midollo osseo (n = 26)	—	19.201 (12.922-25.480)	—
Sangue periferico (n = 74)	—	21.136 (17.834-24.437)	—

### Quote di falsi positivi e falsi negativi

I falsi 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 (1/2, 2/3 o 3/3).

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.

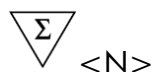
## Riferimenti citati

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. et al. (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. et al. (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), chiamate 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	Contenuto	Cat. n°
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Kit (52)	Per 52 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	670125
<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 disclaimer specifici dei prodotti consultare il rispettivo manuale del kit o manuale utente QIAGEN. 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®, Applied Biosystems®, 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 Mbcrl alle seguenti condizioni:

1. Il kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcrl deve essere usato unicamente secondo le istruzioni contenute nel *Manuale del kit ipsogen BCR-ABL1 Mbcrl* 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 Mbcrl* 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 illecite. 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-1361-002 © 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

