UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia - Dipartimento di Medicina – DIMED

Corso di Laurea in

Tecniche di Laboratorio Biomedico

Presidente: Chiarissimo Prof. Matteo Fassan

TESI DI LAUREA

STIMA DELL'IMPRECISIONE DI DUE METODI ANALITICI DIAGNOSTICI BASATI SU TECNOLOGIA PCR REAL TIME E APPLICATI ALLA DIAGNOSTICA ONCOEMATOLOGICA

Relatore: Prof Fassan Matteo

Correlatore: Dr Favarato Mosè

Dr.ssa Beggio Marianna

Laureanda: Maggiolo Martina

Matr. 2087973

Anno Accademico 2024 – 2025

INDICE:

ABSTRACT 1

1.1.1 Efficienza della Real-Time PCR 6

1.2 La Variabilità Analitica 7

1.3 Concetto di errore 8

1.3.1 Base statistica della precisione e calcolo del coefficiente di variazione (CV) 10

1.4 Sindromi Mieloproliferative 11

1.4.1 Neoplasie mieloproliferative Philadelphia positive (MPN Ph+) 11

1.4.2 Neoplasie mieloproliferative Philadelphia negative (MPN Ph-) 14

2. SCOPO 18

3. MATERIALI E METODI 19

3.1 Campioni biologici 19

3.2 Analisi quantitativa del trascritto *BCR-ABL1* 19

3.2.1 Isolazione del buffy coat 19

3.2.2 Estrazione dell'RNA totale 21

3.2.3 Quantificazione dell'RNA totale 24

3.2.4 Amplificazione e Rilevazione del trascritto *BCR-ABL1* 24

3.2.5 Criteri interpretativi *BCR-ABL1* 28

3.3 Analisi quantitativa della mutazione V617F del gene *JAK2* 31

3.3.1 Estrazione del DNA genomico 31

3.3.2 Quantificazione mutazione V617F del gene *JAK2* 33

3.3.3 Criteri interpretativi V617F *JAK2* 36

3.4 Controlli di qualità e tracciabilità 38

3.4.1 Controlli pre-analitici 38

3.4.2 Controlli durante l'estrazione 38

3.4.3 Controlli durante la fase di amplificazione 39

3.4.4 Controlli post analitici 39

3.4.5 Tracciabilità 39

3.4.6 Controllo delle irregolarità 40

4. RISULTATI 41

4.1 Premessa 41

4.2 Analisi *BCR-ABL1* 41

4.2.1 Valutazione della ripetibilità degli standard 42

4.2.2 Valutazione della riproducibilità degli standard 44

4.2.3 Analisi efficienza 47

4.2.4 Analisi variabilità operatore e lotto dipendente 48

4.3 *JAK2* 53

4.3.1 Valutazione della ripetibilità degli standard 53

4.3.2 Valutazione della riproducibilità degli standard 56

4.3.3 Analisi efficienza V617F e WT 57

4.3.4 Analisi variabilità operatore e lotto dipendente 58

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE 65

BIBLIOGRAFIA: 69

ABSTRACT

(Italiano / English version)

Versione Italiana:

Introduzione: La Real Time PCR quantitativa in tempo reale (qPCR) è una tecnica fondamentale nella diagnostica molecolare che permette di rilevare e quantificare specifiche sequenze di DNA o RNA in tempo reale tramite segnali fluorescenti. Questa tecnologia è ampiamente utilizzata nello studio delle neoplasie mieloproliferative (MPN). Nelle forme Philadelphia-positive, come la leucemia mieloide cronica, il monitoraggio del trascritto *BCR-ABL1* guida la valutazione della risposta terapeutica. Nelle forme Philadelphia-negative la qPCR permette di rilevare mutazioni chiave come *JAK2* V617F, supportano diagnosi e gestione clinica.

Scopo: Il presente elaborato si propone di stimare l'imprecisione analitica derivante da lotti di reagenti, operatori e sedute sperimentali, in due metodi analitici diagnostici basati sulla tecnologia PCR Real Time, per *BCR-ABL1* e *JAK2* V617F, valutando l'efficienza delle reazioni, la ripetibilità e la riproducibilità dei risultati.

Materiali e Metodi: Sono stati analizzati campioni di sangue periferico di pazienti con sospetto o diagnosi confermata di MPN. L'RNA estratto manualmente dal buffy coat è stato utilizzato per la ricerca del trascritto *BCR-ABL1* mediante RT-qPCR, con ABL1 come controllo interno.

Il DNA genomico è stato estratto in maniera automatizzata ed è stato analizzato per la mutazione *JAK2* V617F mediante qPCR. Tutte le analisi sono state condotte utilizzando kit CE-IVD, includendo controlli positivi e negativi, standard di calibrazione e analisi in duplicato.

Risultati: Tra gennaio e luglio 2025 sono state eseguite 18 sedute per p210 *BCR-ABL1* e 16 sedute per *JAK2* V617F. Per entrambi i target sono stati valutati la ripetibilità intra-seduta e la riproducibilità inter-seduta, analizzando i valori di Ct degli standard, i parametri delle curve di calibrazione (slope, intercetta, coefficiente di determinazione R^2) e l'efficienza delle reazioni. Le analisi hanno evidenziato buona stabilità e linearità delle curve di calibrazione, con deviazioni standard e coefficienti di variazione generalmente contenuti, confermando la precisione delle misurazioni.

Per entrambi i target, la maggiore variabilità è stata osservata negli standard a bassa concentrazione, mentre gli standard a concentrazione più alta risultano stabili e coerenti. L'analisi della variabilità legata agli operatori e ai lotti di reagenti non ha evidenziato differenze significative, dimostrando la robustezza del metodo e la coerenza dei dati tra sedute, operatori e diversi lotti di standard, sia per il target *BCR-ABL1* sia per *JAK2*.

Conclusioni: I risultati confermano che le metodiche qPCR utilizzate per *BCR-ABL1* p210, ABL1 e *JAK2* V617F/WT sono robuste, riproducibili e conformi agli standard internazionali. La maggiore variabilità osservata negli standard a basse copie era attesa ma non compromette la validità

diagnostica del test. I dati suggeriscono che, per migliorare ulteriormente la precisione, sarebbe utile monitorare costantemente i lotti di reagenti, considerare diluizioni estremamente basse con cautela e valutare l'integrazione di altri geni di riferimento o tecniche di nuova generazione come la digital PCR.

English version:

Introduction: Quantitative Real Time PCR (qPCR) is a fundamental technique in molecular diagnostics, allowing the detection and quantification of specific DNA or RNA sequences in real time through fluorescent signals. This technology is widely used in the study of myeloproliferative neoplasms (MPN). In Philadelphia-positive forms, such as chronic myeloid leukemia, monitoring the BCR-ABL1 transcript guides the assessment of therapeutic response. In Philadelphia-negative forms qPCR allows the detection of key mutations such as JAK2 V617F, supporting diagnosis and clinical management.

Objective: The purpose of this work is to estimate analytical imprecision arising from reagent lots, operators, and experimental sessions in two diagnostic methods based on Real Time PCR technology for BCR-ABL1 and JAK2 V617F, evaluating reaction efficiency, repeatability, and reproducibility.

Materials and Methods: Peripheral blood samples from patients with suspected or confirmed MPN were analyzed. RNA manually extracted from the buffy coat was used for BCR-ABL1 transcript detection by RT-qPCR, with ABL1 as an internal control. Genomic DNA was extracted automatically and analyzed for the JAK2 V617F mutation by qPCR. All analyses were performed using CE-IVD kits, including positive and negative controls, calibration standards, and duplicate analyses.

Results: Between January and July 2025, 18 sessions were performed for p210 BCR-ABL1 and 16 sessions for JAK2 V617F. Intra-assay repeatability and inter-assay reproducibility were evaluated for both targets by analyzing Ct values of standards, calibration curve parameters (slope, intercept, R^2), and reaction efficiency. Analyses showed good stability and linearity of the calibration curves, with generally low standard deviations and coefficients of variation, confirming measurement precision.

For both targets, the greatest variability was observed in low-concentration standards, while high-concentration standards remained stable and consistent. Operator- and reagent lot-related variability showed no significant differences, demonstrating the method's robustness and data consistency across sessions, operators, and standard lots.

Conclusions: The results confirm that the qPCR methods used for BCR-ABL1 p210, ABL1, and JAK2 V617F/WT are robust, reproducible, and compliant with international standards. The greater variability observed in low-copy standards was expected and does not compromise the diagnostic validity of the test. The data suggest that, to further improve accuracy, it would be useful to continuously monitor reagent lots, approach extremely low dilutions with caution, and consider the integration of additional reference genes or next-generation techniques, such as digital PCR.

1. INTRODUZIONE

1.1 PCR quantitativa in tempo reale (qPCR)

La diagnostica di laboratorio basata sulla rilevazione degli acidi nucleici ha conosciuto una profonda evoluzione e diffusione dopo l'avvento, a metà degli anni Ottanta grazie all'invenzione di Kary Mullis, della tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR – Polymerase Chain Reaction) [1], la quale ha rivoluzionato il settore, aprendo la strada a successive innovazioni come la PCR in tempo reale (Real TimePCR)[2].

Questa tecnologia consente non solo di amplificare specifiche sequenze di acido nucleico, ma anche di monitorare il processo di amplificazione mentre avviene, fornendo così informazioni quantitative affidabili e riproducibili.

La Real Time PCR è un'evoluzione della PCR tradizionale (PCR end point), sviluppata e messa a punto da Higuchi, che condivide con il classico metodo di amplificazione il principio di base dell'amplificazione enzimatica del DNA aggiungendo però un sistema di rilevazione in tempo reale della fluorescenza, la quale risulterà direttamente proporzionale alla quantità di amplificato prodotto e che può consentire la quantificazione degli amplificati mediante l'utilizzo di una retta di taratura.[3]

Le fasi del ciclo di PCR sono tre: (1) denaturazione della doppia elica del DNA (a 94-95 °C) che consente la separazione fisica dei due filamenti complementari, (2) annealing o ibridazione (a 50-65 °C) dove avviene l'ibridazione dei primer oligonucleotidici e della sonda, (3) sintesi o allungamento (a 72 °C) di un nuovo filamento complementare alla sonda ad opera della DNA Taq polimerasi (polimerasi termostabile).[4]

Il cambio di temperatura che deve avvenire nelle diverse fasi della reazione di PCR è detto ciclo termico ed è necessario ai fini della corretta riuscita della reazione (Figura 1).

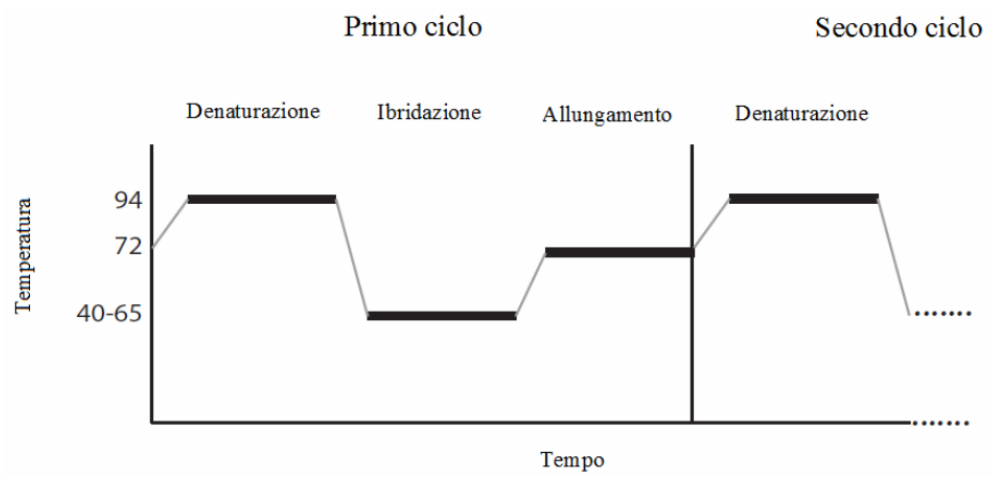

Figura 1: Ciclo termico della reazione della PCR.[5]

Queste 3 fasi vengono ripetute un certo numero di volte (cicli della PCR) in modo tale da aumentare il numero di copie della sequenza di DNA d'interesse. Il ripetersi del ciclo termico è reso possibile dal termociclatore, strumento in grado di eseguire ciclicamente i cambi di temperatura necessari in tempi molto brevi. Al fine di innescare la reazione di amplificazione la polimerasi necessita di piccole sequenze nucleotidiche, i *primers*, che si legano a specifiche regioni del genoma: la coppia di primer, *forward* (capace di legarsi all'estremità 5' del DNA templato da amplificare) e *reverse* (capace di legarsi all'estremità 3' del DNA templato da amplificare), deve essere creata con appropriate caratteristiche al fine di appaiarsi in maniera specifica a monte e a valle della regione genica da amplificare.
Il monitoraggio in tempo reale dell'aumento esponenziale delle copie di amplicone, qualora presente nel materiale di partenza, avviene mediante l'aggiunta di sonde specifiche marcate con molecole fluorescenti.

La metodica TaqMan® sfrutta il principio dell'idrolisi di un oligonucleotide a doppio fluoroforo, noto anche come sonda TaqMan. Questa sonda oligonucleotidica che si ibrida con uno dei filamenti del templato (permettendo la rilevazione specifica di sequenze nucleotidiche bersaglio complementari alla sonda stessa), è coniugata con un fluoroforo ed un quencher. Il fluoroforo, definito reporter, è coniugato all'estremità 5' della sonda mentre all'estremità 3' vi è coniugata una molecola quencher. Quando il fluoroforo si trova stericamente vicino alla molecola quencher, quindi entrambi legati alla sonda, il quencher assorbe la fluorescenza emessa dal fluoroforo report che a sua volta è stato eccitato da un'opportuna sorgente luminosa interna al termociclatore. In questo modo, quando la sonda è integra non c'è emissione di fluorescenza (meccanismo di quenching).
Nel momento in cui la sonda risulta essere perfettamente ibridata alla sequenza bersaglio, essa viene scissa durante la fase di estensione dalla DNA Taq polimerasi poiché dotata di attività esonucleasica 5'→3'.
Tale separazione interrompe il meccanismo di quenching e consente l'emissione di un segnale fluorescente, la cui intensità è direttamente proporzionale alla quantità di prodotto amplificato (Figura 2).
Una volta avvenuto il taglio (cleavage) della sonda nella fase di estensione, la fluorescenza emessa dal reporter viene raccolta da un rilevatore presente nel termociclatore. Questo genera, in tempo reale, un grafico relativo alla quantità di fluorescenza rilevata in funzione del numero di cicli ripetuti.[5,6]

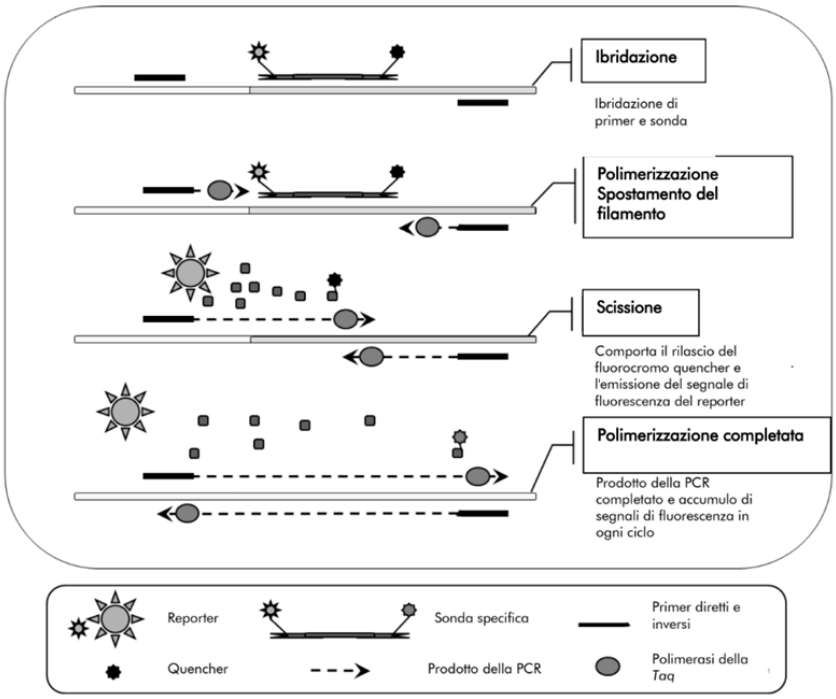

Figura 2: Rappresentazione schematica del funzionamento della qPCR e della sonda Taqman[6]

Il grafico della rilevazione dell'intensità di fluorescenza nel tempo sarà una curva sigmoide costituita da una fase esponenziale ed una fase di plateau; il punto di flesso della curva è indicato come il valore soglia (threshold line) corrispondente al momento in cui la fluorescenza del campione ha un segnale di intensità 10 volte superiore al rumore di fondo. Il numero di cicli di amplificazione necessario a raggiungere il valore soglia è definito Cycle threshold (Ct), valore che risulta quindi indirettamente proporzionale alla quantità iniziale (numero di copie) della sequenza da analizzare (figura 3).

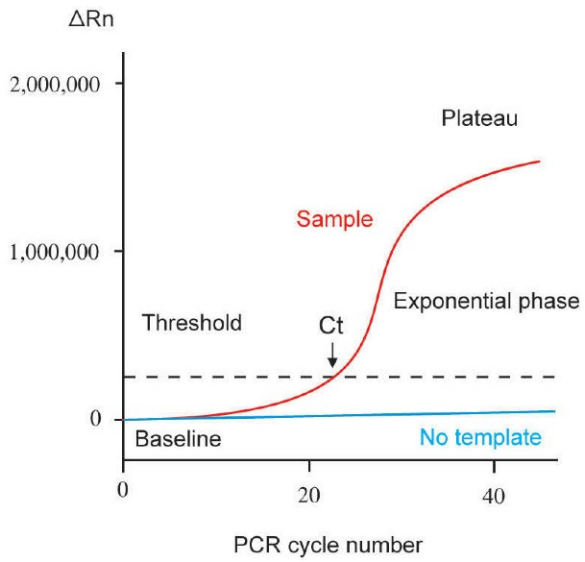

Figura 3: Curva di amplificazione qPCR: la fluorescenza cresce esponenzialmente fino al valore soglia (Ct), per poi raggiungere il plateau.

Questo approccio si applica sia all'analisi di mutazioni germinali o somatiche, avendo come materiale di partenza il DNA, sia alla rilevazione di trascritti, avendo come campione iniziale l'RNA. Nel caso in cui l'acido nucleico di partenza sia a singolo filamento, il protocollo prevede la formazione di un cDNA (DNA complementare) che funge da stampo per le successive tappe di amplificazione mediante l'utilizzo dell'enzima retrotrascrittasi inversa: in questo caso la metodica verrà identificata come RT-Real Time PCR. La Real Time PCR può essere utilizzata non solo per rilevare la presenza o meno di uno specifico target genico, ma anche per quantificare quello specifico amplificato. In questo caso la metodica si definisce Real Time PCR quantitativa (qPCR) e necessita di una retta di taratura e di una successiva normalizzazione del prodotto rilevato rispetto o ad un gene housekeeping o ad un allele wild-type.
In tutte le sue possibili applicazioni, la Real Time PCR permette di ottenere dati qualitativi e/o quantitativi in modo rapido e accurato, garantendo elevata specificità, sensibilità e riproducibilità.

1.1.1 Efficienza della Real-Time PCR

L'efficienza di amplificazione nella reazione a catena della polimerasi (PCR) fornisce un'indicazione sulla capacità della DNA polimerasi di produrre molecole di templato durante ciascun ciclo della reazione.
Quando l'efficienza di reazione è pari al 100%, la quantità di prodotto raddoppia a ogni ciclo, aumentando dunque in maniera esponenziale. Tuttavia, possono presentarsi una serie di inibitori che possono rallentare e diminuire la capacità della DNA polimerasi di produrre amplificati comportando una resa non ottimale della reazione stessa. Tra questi troviamo componenti del campione biologico (ad esempio emoglobina, urea, polisaccaridi e polifenoli), contaminazioni da carry-over che derivano da reazioni preparative precedenti e agenti chelanti quali l'EDTA, tutti in grado di interferire con l'attività enzimatica o con la disponibilità di ioni Mg^{2+}, necessari alla buona riuscita della reazione.

L'efficienza di amplificazione viene calcolata mediante la pendenza (slope) dalla curva standard, ottenuta da diluizioni seriali di un campione a titolo noto e dai corrispondenti valori di Ct ottenuti.
La relazione matematica comunemente utilizzata è:

$$E=(10^{(-1/slope)}-1)\times 100$$

Dove la slope viene ricavata dall'equazione della retta:

$$y = mx + q$$

Dove: x rappresenta la concentrazione del target ignoto espresso come logaritmo in base 10, y è il valore di Ct (Cycle threshold), m è la slope e q è l'intercetta (punto dove la retta interseca l'asse delle y).

Con un'efficienza del 100% si avrà un valore di slope di circa -3,32.
Vengono considerati accettabili, e quindi in grado di generare una quantificazione affidabile, valori compresi tra il 90% e il 110% che si traducono con un valore di slope compresa tra -3,6 e -3,1.
I valori di efficienza rivestono un ruolo particolarmente rilevante nell'utilizzo della PCR real-time. Differenze anche minime possono compromettere la precisione: una variazione del 5% nell'efficienza comporterà una differenza pari al triplo nella quantità di DNA dopo 20 cicli di amplificazione.
A dimostrazione di ciò, si prende in considerazione la formula generale per la quantificazione dell'amplificazione:

$$Y = N_0 \, x \, (1 + E)^n$$

Dove Y è il numero di copie finali, N_0 è il numero iniziale di copie del templato, E è l'efficienza della reazione (quando E=1 l'efficienza sarà del 100%) e n sono il numero di cicli di amplificazione.
In una situazione ideale di una reazione con slope pari a -3,32 e un'efficienza di circa il 100%, ipotizzando il numero di cicli di amplificazione pari a 20 e un singolo templato iniziale (N_0=1), il valore di efficienza che si ottiene sarà;

$$Y= 1(1+1)^{20}= 2^{20} = 1.048.576 \text{ copie}$$

Se invece l'efficienza scende al 90%, l'equazione diventerà;

$$Y= 1(1+0.9)^{20}= 1.9^{20} = 375.900 \text{ copie}$$

Questo esempio evidenzia come anche una piccola variazione dell'efficienza possa ripercuotersi sulla quantificazione delle copie dell'acido nucleico d'interesse.

1.2 La Variabilità Analitica

Le determinazioni quantitative sia degli alleli mutati rispetto al totale degli alleli, sia dei trascritti genici rispetto al target di riferimento (housekeeping gene) richiedono l'impiego di saggi di PCR robusti e precisi al fine di garantire un'efficienza ottimale.
In particolare, con il termine precisione si intende il grado di convergenza dei dati ottenuti rispetto al valore medio della serie a cui appartengono, in altre parole la loro varianza (o deviazione standard) rispetto alla media campionaria[7].

Diverso è invece il concetto di accuratezza che indica il grado di corrispondenza del dato teorico, ottenuto da una serie di campioni misurati con il valore reale o di riferimento. Rappresenta dunque la vicinanza del dato misurato rispetto a quello atteso e risulta influenzata sia da errori casuali sia da errori sistematici[8].

La precisione è un aspetto centrale nei processi di verifica e convalida dei metodi analitici.

Nel momento in cui deve essere valutata risulta essere necessario distinguere due componenti principali, la ripetibilità che esprime la precisione a breve termine (intra-analisi) e la riproducibilità, che riflette la precisione a lungo termine (inter-analisi)[7].

La ripetibilità viene stimata mantenendo costanti tutte le condizioni operative, ovvero stesso laboratorio, operatore, apparecchiatura, metodo e materiale e rappresenta il massimo livello di accordo tra misurazioni consecutive[9].

La riproducibilità viene invece definita come l'accordo tra misurazioni ripetute nel tempo e in condizioni variabili, operatori diversi, strumenti, reagenti, laboratori e persino differenti metodiche[7,9].

In letteratura, la precisione viene definita come un concetto di qualità stimato quantitativamente come opposto (imprecisione) ed espresso come deviazione standard o coefficiente di variazione[9].

È importante sottolineare che, quando i risultati di laboratorio sono utilizzati a supporto della diagnosi medica, l'incertezza totale dell'analisi rappresenta solo in parte la variazione analitica in quanto devono essere considerate tutte le variazioni come quelle biologiche, pre-analitiche e post-analitiche. In quest'ottica, le specifiche di prestazione dei test diagnostici non dovrebbero tenere conto solo dell'incertezza analitica ma anche dell'incertezza diagnostica dell'intero processo di test.

Metodi di valutazione dell'incertezza si sono dimostrati utili per questo scopo anche se essi non risultano ancora standardizzati per tutte le aree della medicina di laboratorio. .[9]

1.3 Concetto di errore

In ogni esperimento analitico si possono distinguere due principali fonti di errore: l'errore casuale e l'errore sistematico.

L'errore casuale è associato a imperfezioni intrinseche alla progettazione sperimentale ed è caratterizzato da variabilità imprevedibile tra misurazioni replicate. Questo tipo di errore varia in maniera imprevedibile.

La variabilità biologica ne è un esempio rilevante. Nel contesto della biologia molecolare, gli acidi nucleici sono estremamente sensibili alle differenze biologiche intrinseche tra i campioni. Per ridurre l'impatto di questo tipo di errore è necessaria un'attenta pianificazione sperimentale, una selezione randomizzata dei campioni ed un numero di campioni per gruppo biologico statisticamente significativo. Anche l'errore di sotto campionamento rientra del contesto degli errori casuali, il quale

si verifica quando solo una porzione limitata della popolazione viene analizzata. In questo caso, l'errore è associato a una possibile stima non accurata relativa alla quantificazione del numero di molecole target di una porzione del campione scelto.

D'altro canto, l'errore sistematico ha natura prevedibile e tende a ripresentarsi in modo costante nel corso delle varie sedute analitiche. Questo tipo di errore rimane costante o varia in modo prevedibile. Tale tipo di errore è generalmente associato a errori di strumentazione, come artefatti di calibrazione, malfunzionamenti o limitazioni dei software di acquisizione dati e a errori di tecnica, dove sono incluse imprecisioni dovute alla manualità dell'operatore (ad esempio nell'uso delle micropipette), contaminazioni di acidi nucleici o gestione inadeguata dei controlli. Altri fattori rilevanti riguardano il trattamento del campione stesso, delicate sono infatti le procedure di raccolta, estrazione e retrotrascrizione degli acidi nucleici che richiedono un'attenzione particolare per non inficiare sul risultato finale che si ottiene. In particolare, la labilità di DNA e RNA rende il processo suscettibile a variazioni ambientali minime. Anche la scelta della chimica di estrazione è critica, infatti l'eventuale presenza di inibitori può causare artefatti o ritardi nell'amplificazione con conseguente alterazione del valore di Ct[10].

In altri termini, l'errore totale è composto da una componente sistematica, ovvero l'errore sistematico comunemente denominato bias, e da una componente casuale, l'imprecisione.

Se un materiale di riferimento viene ripetutamente misurato più volte con il medesimo metodo analitico di routine in condizioni replicate, la differenza tra il valore medio ottenuto e il valore di riferimento assegnato rappresenta il bias mentre la dispersione dei risultati, espressi come deviazione standard, rappresenta l'imprecisione[11].

Il concetto di errore, com'è stato presentato fino a questo momento, presuppone che sia possibile calcolare la differenza tra il risultato della misurazione e il valore della quantità di riferimento (valore biologico reale). Secondo la *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (GUM) e il *Vocabolario Internazionale di Metrologia* (VIM), non è corretto adottare il concetto di "valore reale", poiché le misurazioni sono considerate come un processo volto a stimare valori quantitativi che non dipendono da un'entità assoluta preesistente. L'incertezza di misura (MU) è dunque definita come parametro che riflette la dispersione dei risultati rispetto a un valore di riferimento pragmatico, o valore target, senza implicare l'esistenza di un valore reale privo di errori.

Un'ulteriore distinzione riguarda le distorsioni a breve termine, riconducibili a fattori come ricalibrazioni, e le distorsioni a lungo termine, che emergono nel tempo e risultano spesso difficili da distinguere. Tali distorsioni, se non corrette, contribuiscono ad aumentare la componente casuale dell'incertezza di misura[9].

1.3.1 Base statistica della precisione e calcolo del coefficiente di variazione (CV)

Secondo le definizioni fornite da GUM e VIM, citate in precedenza, l'imprecisione rappresenta un parametro associato al risultato di una misurazione che descrive la dispersione dei valori rispetto a un indice di tendenza centrale. Per valutare questo aspetto risulta necessaria l'adozione di misure di statistica descrittiva, in particolare le misure di variabilità.
Le principali misure di dispersione utilizzate sono in ambito metrologico per misurare la variabilità di un insieme di dati sono la Deviazione Standard (DS) e il Coefficiente di Variazione (CV).

La Deviazione standard (SD) rappresenta il parametro di base per la stima dell'incertezza di misura (MU), indicata con il simbolo u.
La Deviazione Standard permette un confronto tra la distanza media dei valori osservati in un gruppo di dati rispetto e la media aritmetica della serie. La sua formula è:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x - x')^2}{n - 1}}$$

Dove x' è la media dei valori ottenuti in diverse misurazioni; x è il valore della singola misurazione e n è il numero di repliche del campione.

Il Coefficiente di variazione (CV) è una misura che permette di confrontare la variabilità relativa tra due o più serie di dati che rappresentano quantità diverse con unità di misure diverse. Il CV si calcola come rapporto tra la deviazione standard di una serie di valori con la sua media, moltiplicato per 100. Poiché la Deviazione Standard e la media hanno la stessa unità di misura, il CV risulta un numero adimensionato.
La sua formula è:

$$CV = \frac{S}{x} x100\%$$

Il CV è quindi un indicatore della variabilità relativa ed è particolarmente utile per confrontare serie di dati di natura diversa. Proprio perché indipendente dalle unità di misura esso può essere utilizzato per eseguire una comparazione sul livello di precisione di metodiche differenti o di osservazioni provenienti da contesti sperimentali diversi[12].

1.4 Sindromi Mieloproliferative

Le cellule staminali ematopoietiche pluripotenti possiedono una capacità di autorinnovamento e di differenziazione tale da permettere l'origine delle due principale linee cellulari, mieloide e linfoide, dalle quali derivano tutte le cellule del sangue maturo.

Il processo attraverso cui queste cellule si originano e maturano è noto come ematopoiesi. Quest'ultima ha luogo nel midollo osseo ed è regolata da segnali molecolari complessi.[13] Nella linea cellulare mieloide eventuali errori e anomalie in questo delicato meccanismo possono determinare l'insorgenza di un gruppo eterogeneo di disordini emopoietici clonali noti come neoplasie mieloproliferative (MPN).[13,14]

La leucemia mieloide cronica (LMC), la policitemia vera (PV), la trombocitemia essenziale (TE) e la mielofibrosi primaria (PMF) rappresentano i quattro principali sottotipi classici di neoplasie mieloproliferative.[13] Tra queste, la LMC è caratterizzata dalla presenza del riarrangiamento genico *BCR-ABL1* (Philadelphia-positiva), mentre PV, TE e PMF sono considerate MPN Philadelphia-negative, in quanto non presentano tale alterazione genetica.[15]

Oltre a queste la classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) include tra le MPN la leucemia neutrofila cronica (CNL), la leucemia eosinofila cronica (CEL) e le neoplasie mieloproliferative non altrimenti classificabili (MPN-U).[14]

Nel 2022 un gruppo internazionale di esperti, composto da ematopatologi, oncologi e genetisti, ha apportato degli aggiornamenti nella classificazione dei tumori ematopoietici pubblicando la nuova International Consensus Classification (ICC), evoluzione della quarta edizione fornita precedentemente dall'OMS.[16] Tale classificazione, per quanto riguarda le neoplasie mieloproliferative (MPN), ha confermato il ruolo primario che riveste l'analisi della morfologia del midollo osseo (BM), riconoscendo al tempo stesso l'impatto complementare e integrativo dei marcatori genetici (come le mutazioni nei geni *JAK2*, CALR, MPL, *BCR-ABL1*).[14]

In linea con i principi classificativi, la diagnosi di MPN si avvale quindi di un approccio integrato che prende in considerazione non solo l'aspetto morfologico del midollo osseo e dei reperti ematologici (emocromo e strisci di sangue periferico), ma anche le informazioni molecolari e citogenetiche.[15]

1.4.1 Neoplasie mieloproliferative Philadelphia positive (MPN Ph+)

Le neoplasie mieloproliferative Philadelphia positive (MPN Ph+) sono un gruppo di disordini clonali cronici, caratterizzati da una proliferazione mieloide eccessiva e dalla presenza del cromosoma Philadelphia, risultato della formazione dell'oncogene di fusione *BCR-ABL1*.[17]

La forma più frequente di MPN Ph+ è la leucemia mieloide cronica (LMC), patologia in cui si osserva una proliferazione predominante di granulociti. La LMC è caratterizzata dalla presenza del

cromosoma di Philadelphia, derivante da una traslocazione reciproca bilanciata t(9;22)(q34;q11.2) che genera l'oncogene di fusione *BCR-ABL1*.[18]

I livelli di RNA messaggero (mRNA) di *BCR-ABL1* nel sangue periferico rappresentano un indicatore rapido e accurato dell'attività e del carico della malattia.[19,20]

Per l'analisi del gene *BCR-ABL1*, si utilizzano sia metodiche qualitative, che identificano la presenza o assenza del trascritto di fusione, fondamentali per la diagnosi iniziale, sia metodiche quantitative, che permettono di misurare con precisione i livelli di trascritto *BCR-ABL1*, analisi essenziale per monitorare la risposta al trattamento e valutare la malattia minima residua.[21,22]

La periodicità di monitoraggio della trascrizione *BCR-ABL1* durante il trattamento è altamente correlato con gli esiti clinici: il raggiungimento di una risposta molecolare maggiore (MMR) è associato a una bassa probabilità di resistenza o progressione della malattia.[23–25]

La scoperta del ruolo patogenetico dell'oncogene *BCR-ABL1* ha rappresentato una svolta nell'approccio diagnostico e terapeutico della leucemia mieloide cronica (LMC) consentendo una classificazione precisa della patologia e favorendo lo sviluppo di terapie mirate come gli inibitori della tirosin-chinasi (TKI)[23,26,27] in grado di inibire l'attività enzimatica della proteina di fusione. Uno dei farmaci appartenenti a questa classe, e utilizzato come trattamento di prima linea per queste malattie oncologiche è l'Imatinib.[28] Secondo studi clinici tale trattamento risulta essere più efficace rispetto alle precedenti terapie,[29] dimostrato che la sopravvivenza a 10 anni per i pazienti con LMC è aumentata drasticamente, passando da circa il 20% a oltre l'80%. Inoltre, Imatinib permette di ottenere una riduzione profonda e duratura della malattia (Deep Molecular Response, DMR) nella maggior parte dei pazienti, con una stabilità della risposta mantenuta nell'80% dei casi.[30]

Il gene BCR (Breakpoint Cluster Region) è localizzato a livello del cromosoma 22, nella regione 22q11.2, è composto da 23 esoni e codifica per una proteina multifunzionale coinvolta in numerosi processi cellulari come la regolazione del citoscheletro, la trasduzione del segnale e la risposta allo stress ossidativo. Tale proteina presenta vari domini funzionali tra cui un dominio di oligomerizzazione (CC), un dominio chinasi serina/treonina (S/T), un dominio di omologia di scambio (DH), un sito di legame per il calcio (CaLB) e una proteina RAC attivante le GTPasi (RAC-GAP).[31]

Il gene ABL1 (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) è localizzato sul cromosoma 9, nella regione 9q34.1. Esso è costituito da 11 esoni e codifica per una tirosin chinasi non recettoriale che svolge un ruolo fondamentale nella regolazione della crescita cellulare, della migrazione e dell'adesione cellulare. La proteina ABL1 contiene vari domini funzionali, tra cui domini SH3 e SH2, un dominio tirosina chinasi (Y-kinase), un dominio di legame per l'actina (ABD), un dominio di

legame per il DNA (DBD), segnali di localizzazione nucleare (NLS) e un segnale di esportazione nucleare (NES).[31]

La traslocazione reciproca t(9;22)(q34;q11.2) tra i cromosomi 9 e 22 porta alla formazione del cromosoma Philadelphia (Ph), che è caratteristico della leucemia mieloide cronica (LMC). Questa traslocazione comporta la fusione del gene BCR sul cromosoma 22 con il gene ABL1 sul cromosoma 9, risultando nella formazione del gene di fusione *BCR-ABL1*[32] (Figura 4).[33]

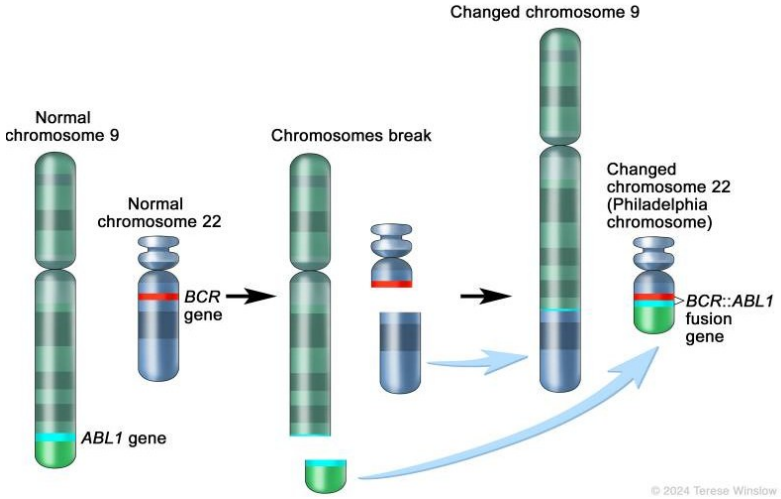

Figura 4: Il cromosoma Philadelphia è una traslocazione tra l'oncogene ABL1 (presente sul braccio lungo del cromosoma 9) e il gene BCR (presente sul braccio lungo del cromosoma 22), con conseguente formazione del gene di fusione *BCR-ABL1*.

La formazione della traslocazione è caratterizzata dal susseguirsi di tre passaggi: l'insorgenza di più rotture del doppio filamento di DNA su cromosomi diversi, l'associazione fisica della parte finale delle rotture e il ricongiungimento dei cromosomi rotti. Tali rotture possono originare da processi fisiologici, da stress replicativo, da esposizione a fattori esogeni o da errori nei meccanismi di riparo del DNA.[34] Nella maggior parte dei casi di LMC e in circa un terzo dei pazienti con leucemia linfoblastica acuta a cellule B Philadelphia-positive (Ph+ B-ALL), la rottura avviene nella regione maggiore del cluster di rottura (anche chiamata M-bcr), che si estende per circa 5,8 kb e comprende gli esoni e12-e16. In questa sede, lo splicing alternativo del trascritto *BCR-ABL1* produce le isoforme b2a2 o b3a2, che codificano per la proteina chimerica p210.

In circa due terzi dei casi di Ph+ B-ALL (B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia) e raramente nella LMC, la rottura si verifica nella regione minore denominata m-bcr (regione minore del cluster di rottura) lunga circa 54,4 kb e situata tra gli esoni e2' ed e2. Ciò da origine al trascritto e1a2, che codifica per la proteina di fusione p190.

Esiste infine una terza sede di rottura meno frequente, detta u-bcr (regione superiore) associata a forme di leucemia neutrofila cronica e causante la produzione della proteina p230.[35,36]

La differenza tra tali isoforme è rilevante non solo per la diagnosi, ma anche per la prognosi e il tipo di risposta alla terapia. Ad esempio, p190 è più frequentemente associata a leucemie acute linfoblastiche con decorso aggressivo mentre p210 è tipica della LMC.[36]

Il monitoraggio molecolare quantitativo del *BCR-ABL1* viene eseguito partendo da RNA isolato da sangue periferico: in questa analisi, infatti, è necessario valutare il trascritto e, di conseguenza, la proteina derivante dalla traslocazione *BCR-ABL1*.

La RT-qPCR è ad oggi il metodo di riferimento per il monitoraggio della malattia minima residua (MRD) nei pazienti con LMC.

Eventuali variazioni di tecniche analitiche utilizzate nei diversi laboratori può provocare l'acquisizione di risultati diversi tra le varie realtà laboratoristiche e per questo motivo non confrontabili. Per far fronte a tale possibilità, sono state introdotte delle linee guida standardizzate a livello internazionale dall'International Scale (IS). Basandosi su tale sistema è possibile esprimere i livelli di *BCR-ABL1* come percentuali rispetto a un valore di riferimento standard. Così facendo è possibile garantire la comparabilità dei dati risultati da analisi provenienti da centri e da studi clinici differenti.[37]

Questa standardizzazione è fondamentale per garantire l'accuratezza nella valutazione della risposta terapeutica ad eventuali trattamenti in atto, inclusa la definizione della risposta molecolare maggiore (MMR, ≤0,1% IS) e delle risposte molecolari profonde (MR4, MR4.5), parametri cruciali per la prognosi e per l'eventuale sospensione del trattamento.[38] La risposta molecolare maggiore (MMR) è definita come una riduzione di almeno 3 log del trascritto *BCR-ABL1* rispetto al valore di base (≤0,1% IS), mentre le risposte molecolari profonde (MR4 e MR4.5) corrispondono a riduzioni ancora maggiori (≤0,01% e ≤0,0032% IS, rispettivamente), e rappresentano obiettivi fondamentali nella gestione a lungo termine della LMC, in particolare per arrivare alla sospensione della terapia (treatment-free remission, TFR).[39,40]

Le linee guida europee più recenti forniscono raccomandazioni dettagliate su diversi aspetti del monitoraggio molecolare, tra cui la tipizzazione dei trascritti *BCR-ABL1* (p210, p190, p230) e sulla gestione delle mutazioni causative della resistenza agli inibitori tirosin-chnasici (TKI). Questi aspetti risultano essere fondamentali per ottimizzare la terapia personalizzata e per valutare l'efficacia della risposta terapeutica.[41]

1.4.2 Neoplasie mieloproliferative Philadelphia negative (MPN Ph-)

Le neoplasie mieloproliferative (MPN) Philadelphia-negative costituiscono un gruppo eterogeneo di disordini clonali delle cellule staminali ematopoietiche, caratterizzati da una proliferazione incontrollata della linea mieloide e da un conseguente rischio di evoluzione in leucemia mieloide

acuta.[42] Queste neoplasie sono più diffuse nella popolazione anziana (età media alla diagnosi è di circa 60 anni) e raramente riscontrate in età pediatrica.[43]

Tra i principali sottotipi delle MPN Ph− rientrano la policitemia vera (PV), la trombocitemia essenziale (TE) e la mielofibrosi primaria (PMF), tutte accomunate dall'assenza del cromosoma Philadelphia e dalla presenza di mutazioni in tre geni driver: *JAK2* (*Janus chinasi 2*), *CALR* (*calreticulina*) e *MPL* (*myeloproliferative leukemia virus oncogene*).[44]

La positività ad ognuna di queste mutazioni è in grado di influenzare significativamente il fenotipo clinico e la conseguente gestione della terapia. La mutazione *JAK2* V617F è la più frequente e riscontrata in circa il 90-95% dei pazienti con PV e nel 50–60% dei casi di TE e PMF. Nei pazienti *JAK2*-negativi, si riscontrano con maggiore frequenza le mutazioni di CALR, presenti nel 50–80% dei casi di TE e PMF e in secondo luogo le mutazioni di *MPL*, che si osservano nel 3–5% dei pazienti con TE e nel 5–8% con PMF.[45]

1.4.2.1 Janus chinasi 2 (*JAK2*)

Le Janus chinasi (JAK) sono tirosin-chinasi citoplasmatiche non recettoriali che svolgono un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale intracellulare, attivate da numerosi recettori delle citochine, i quali sono privi di attività enzimatica intrinseca.[46]

Al legame della citochina con il proprio recettore, le JAK associate alle porzioni citoplasmatiche di quest'ultimo vengono attivate per fosforilazione, inducendo a loro volta la fosforilazione di specifici fattori di trascrizione della famiglia STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) (Figura 5), che sono tra i principali effettori a valle di JAK. La cascata di segnalazione JAK/STAT regola numerosi processi biologici fondamentali, tra cui la proliferazione cellulare, la differenziazione, l'apoptosi e la risposta immunitaria.[47]

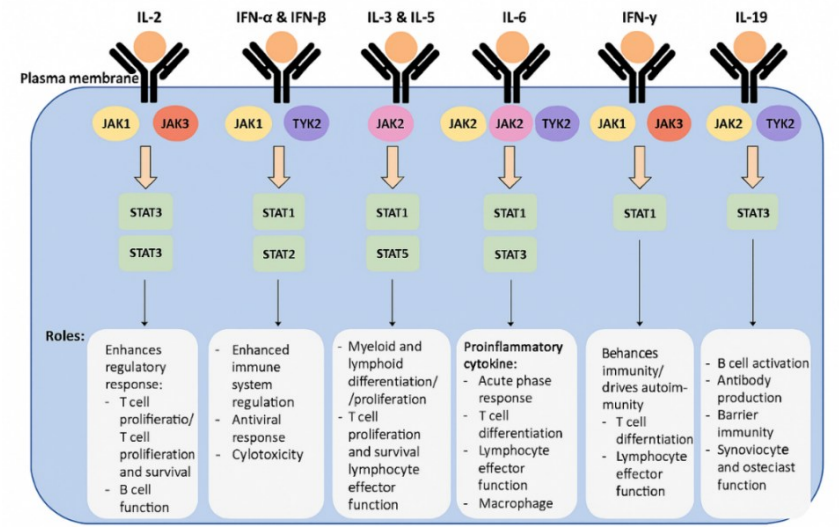

Figura 5: Rappresentazione dei percorsi di segnalazione JAK-STAT attivati da diverse citochine.

La famiglia JAK è composta da quattro membri: *JAK1, JAK2, JAK3* e *TYK2*. In particolare, *JAK1*, *JAK2* e *TYK2* sono espressi in maniera ubiquitaria nei diversi tessuti mentre JAK3 è espresso in modo più selettivo, prevalentemente nei tessuti mieloidi e linfoidi.[46,48]

A livello strutturale, le proteine JAK condividono una struttura composta da sette domini di omologia (JH1-JH7), organizzati in quattro domini funzionali principali:

- il dominio FERM (JH7-JH5), coinvolto nell'interazione con i recettori delle citochine e con la membrana cellulare;
- il dominio SH2-like (JH4), coinvolto nel riconoscimento di sequenze fosforilate;
- il dominio pseudochinasi JH2 svolge una funzione di regolazione negativa sull'attività catalitica delle chinasi, agendo da meccanismo di autoinibizione;
- il dominio chinasi catalitico JH1, responsabile dell'attività tirosin-chinasica, ovvero della fosforilazione di residui di tirosina sui substrati target.[46,49]

Grazie al suo ruolo cruciale nell'emopoiesi, *JAK2* rappresenta un punto critico di regolazione, e per questo è spesso bersaglio di mutazioni oncogeniche, implicate non solo nelle MPN, ma anche nella leucemia mieloide acuta e leucemia linfoide.[46]

L'attivazione persistente di *JAK2*, spesso dovuta a mutazioni come *JAK2* V617F, provoca una sovrastimolazione della via JAK/STAT, con un'intensa risposta ai segnali di citochine ematopoietiche come eritropoietina (EPO), trombopoietina (TPO) e GM-CSF. Questo stato di iperattivazione si traduce in panmielosi, ovvero un'eccessiva produzione di globuli rossi, granulociti e piastrine, associata ad alterazioni qualitative e funzionali delle cellule staminali ematopoietiche.[50]

La mutazione puntiforme *JAK2* V617F rappresenta l'alterazione genetica più frequente nelle MPN Ph-.

Essa consiste nella sostituzione di una guanina (G) con una timina (T) al nucleotide 1849 presente nell'esone 14 del gene *JAK2*, provocando di conseguenza la sostituzione dell'aminoacido valina (V) con fenilalanina (F) nel codone 617, situato nel dominio pseudochinasi JH2.

In condizioni fisiologiche, il dominio JH2 esercita una funzione di autoinibizione sull'attività enzimatica tirosin-chinasica del dominio JH1. Tuttavia, la presenza della mutazione V617F compromette questo meccanismo di regolazione, determinando l'attivazione costante della proteina *JAK2*, anche in assenza di segnali extracellulari.[51] Questa attivazione aberrante stimola in modo cronico la via di segnalazione JAK/STAT, contribuendo alla proliferazione incontrollata delle cellule ematopoietiche tipica delle MPN.[52]

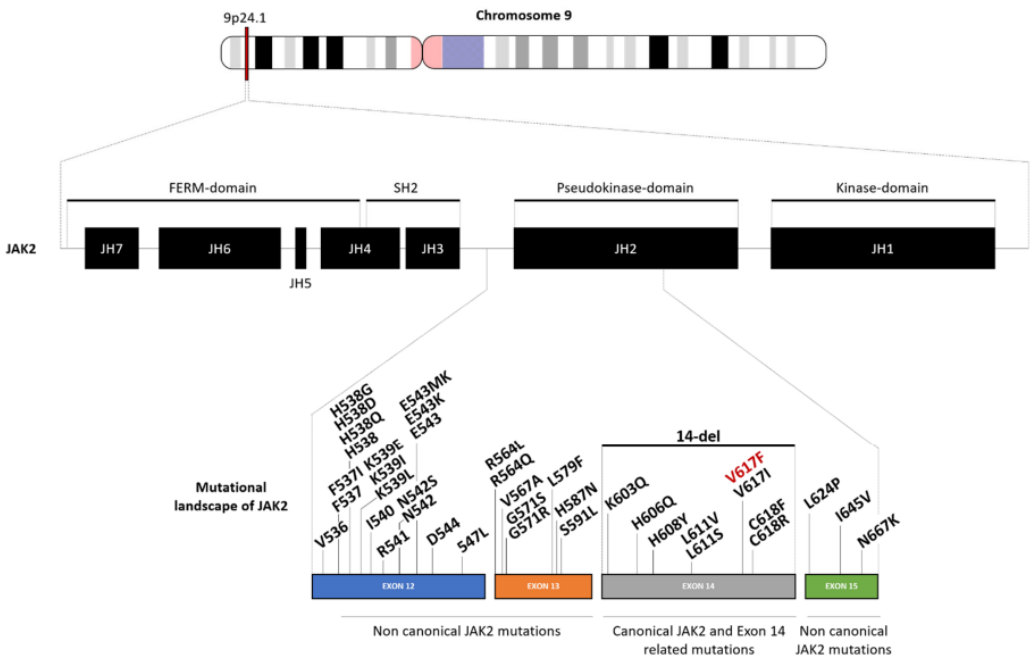

Figura 6: Schema della struttura del gene *JAK2*, localizzato sul cromosoma 9 (9p24.1), con i suoi sette domini di omologia (JH1-JH7) che corrispondono a quattro domini funzionali: FERM, SH2, pseudochinasico (JH2) e chinasi (JH1). Nelle MPN, la mutazione V617F interessa principalmente il dominio JH2, alterandone la funzione regolatoria e causando l'attivazione costitutiva di *JAK2*.[53]

L'identificazione della mutazione *JAK2* V617F è di fondamentale importanza nella diagnosi differenziale delle MPN Ph−, ed è riconosciuta come criterio diagnostico chiave dalle linee guida WHO.[54]

Per la rilevazione della mutazione *JAK2* V617F vengono comunemente utilizzate tecniche molecolari come la PCR allele-specifica e il Next Generation Sequencing (NGS). Il sequenziamento Sanger, inizialmente usato, ha una sensibilità limitata, mentre la PCR allele-specifica migliora il rilevamento della mutazione, soprattutto in presenza di carichi allelici bassi.

Attualmente, la PCR quantitativa in tempo reale (qPCR) è il gold standard per la quantificazione accurata della mutazione.[54–56]

Sebbene la mutazione *JAK2* V617F abbia un ruolo ben definito nella diagnosi delle neoplasie mieloproliferative Ph-, il suo impiego nel monitoraggio della malattia non è ancora standardizzato nella pratica clinica. Studi clinici hanno dimostrato che la qPCR può essere utile per quantificare il carico allelico, specialmente in pazienti sottoposti a terapia con interferone o a trapianto allogenico. Tuttavia, la riduzione del carico allelico non sempre si correla direttamente con la risposta clinica (es. riduzione della splenomegalia), e non esistono linee guida ufficiali che ne raccomandino l'uso routinario nel follow-up.[57]

2. SCOPO

Negli ultimi anni il dato analitico ottenuto mediante tecniche di biologia molecolare ha acquisito sempre più importanza nella pratica clinica. In particolare, la possibilità di quantificare con precisione specifici bersagli molecolari mediante processi di Real Time PCR, ha reso queste metodiche strumenti indispensabili per personalizzare determinati trattamenti farmacologici ed anche per monitorare nel tempo l'andamento della malattia minima residua in alcune patologie ematologiche croniche.

In questo contesto, diventa fondamentale conoscere e stimare il grado d'incertezza che accompagna ogni risultato clinico.

Poiché ogni misura è soggetta ad errori, inevitabili e intrinsechi al processo analitico, si può affermare che il risultato di una misurazione è completo solo se accompagnato da una dichiarazione quantitativa della sua incertezza.

L'elaborato si propone di analizzare e confrontare le metodiche per la rilevazione e quantificazione delle principali mutazioni genetiche coinvolte nelle neoplasie mieloproliferative, in particolare sulla traslocazione t(9;22)(q34;q11) responsabile della formazione del gene di fusione *BCR-ABL1* e sulla mutazione puntiforme V617F del gene *JAK2*.

Attraverso l'utilizzo della PCR Real Time quantitativa (qPCR), applicata sia a partire da RNA retrotrascritto che da DNA genomico, è stato possibile eseguire una stima sull'imprecisione dei risultati ottenuti con tale metodica.

Utilizzando gli standard analizzati nelle diverse sedute per calcolare le curve standard, l'attenzione è stata rivolta all'analisi dei risultati nella stessa seduta e in sedute differenti, all'efficienza delle diverse reazioni di amplificazione e alla variabilità legata sia all'utilizzo di diversi lotti di reagenti sia all'operatore che conduce l'esperimento. Questi elementi incidono in maniera sostanziale su parametri come qualità del segnale, ripetibilità e riproducibilità, aspetti essenziali per garantire una diagnosi accurata, precoce e standardizzata.

Sebbene i laboratori utilizzino kit diagnostici standardizzati e certificati CE-IVD conformi alle normative europee nei quali le performance dichiarate dal produttore sono utili per una valutazione iniziale, ogni utilizzatore è tenuto ugualmente a verificare in prima persona le prestazioni effettive degli strumenti che utilizza.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campioni biologici

I campioni utilizzati per le analisi molecolari (288 per *BCR-ABL1* e 128 per *JAK2*) sono campioni costituiti da sangue periferico.

Per condurre questo studio sono stati presi in considerazione pazienti con sospetto diagnostico o con diagnosi confermata di neoplasia mieloproliferativa. In particolare, per i pazienti positivi al trascritto di fusione *BCR-ABL1*, l'analisi è stata condotta per il monitoraggio molecolare dell'andamento della malattia nel tempo. Trattandosi di una traslocazione che dà origine a un mRNA chimerico, l'indagine molecolare viene effettuata su RNA totale estratto dai leucociti.

Al contrario, per la ricerca della mutazione *JAK2* V617Fl'analisi è stata condotta su DNA estratto da sangue intero.

Tutte le analisi sono state eseguite presso la UOSD Genetica, Citogenetica e Diagnostica Molecolare dell'Ospedale dell'Angelo di Mestre, ULSS 3 Serenissima.

3.2 Analisi quantitativa del trascritto *BCR-ABL1*

3.2.1 Isolazione del buffy coat

Per l'analisi del trascritto *BCR-ABL1* viene isolato il buffy coat (strato leucocitario-piastrinico) a partire da sangue periferico raccolto in provette K_2EDTA da 3 mL, sei per ogni paziente, per un volume totale di circa 20 mL. Tutti i campioni devono essere processati entro 24 ore dall'arrivo delle provette in laboratorio per garantire l'integrità del campione stesso e dei suoi componenti.

In condizioni sterili sotto cappa laminare e utilizzando materiale monouso, tre provette di sangue vengono unite in una provetta contenitrice, ottenendo così due provette contenenti ciascuna circa 10 mL di sangue intero.

Questi campioni vengono centrifugati a 2800 rpm per 10 minuti al fine di ottenere la frazione leucocitaria (buffy coat) (Figura 7).

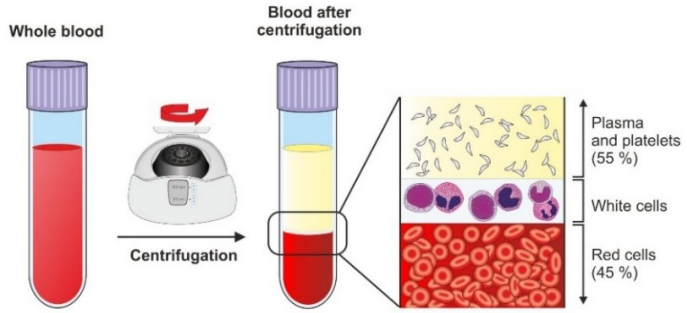

Figura 7: In seguito a centrifugazione il sangue si suddivide nelle tre componenti visibili nella figura. Lo strato leucocitario di nostro interesse è quello intermedio (buffy coat) contenente i globuli bianchi.[58]

Con l'utilizzo di una pipetta Pasteur sterile viene raccolto lo strato di buffy coat e trasferito in un'altra provetta di raccolta. La procedura viene ripetuta con una seconda centrifugata e successiva raccolta per aumentare la resa di estrazione.

L'estrazione dell'RNA totale viene eseguita con il kit **QIAamp ® RNA Blood Mini (50)** [Qiagen, REF 52304]. Al buffy coat si aggiungono 8 mL di buffer EL (Erythrocyte Lysis Buffer) al fine di lisare gli eritrociti raccolti insieme alla frazione di globuli bianchi, non funzionali ai fini dell'analisi. La soluzione è incubata per 10 minuti e successivamente viene eseguita un'ulteriore centrifugazione a 2800 rpm per 10 minuti. Al termine il surnatante viene rimosso con pipetta sterile.

Una seconda lisi dei globuli rossi viene eseguita con l'aggiunta di 3 mL di buffer EL, successiva centrifugazione a 2800 rpm per 10 minuti e rimozione del surnatante con pipetta sterile. I pellet ottenuti sono risospesi ciascuno in 1,5 mL di soluzione fisiologica e uniti in un'unica provetta, quindi centrifugati a 14000 rpm per 1 minuto. Il surnatante viene rimosso con pipetta sterile e viene eseguito un ultimo lavaggio del pellet cellulare con 2 mL di soluzione fisiologica e centrifugato a 14000 rpm per 1 minuto. Dopo aver accuratamente rimosso il surnatante il pellet è risospeso in 1 mL di soluzione conservante composta da 1 mL di buffer RLT con 1 µL di β-mercaptoetanolo e conservato a –80 °C fino alla fase successiva di estrazione dell'RNA.

Il buffer RLT è un buffer di lisi contenente guanidina tiocianato, un agente denaturante, che viene usato per lisare le cellule e inattivare le RNasi, preservando l'integrità dell'RNA. La sua combinazione con il β-mercaptoetanolo (BME) permette di rafforzare l'inattivazione delle RNasi impedendo che esse possano degradare l'RNA e permettendo di mantenere l'integrità.

I reagenti utilizzati per questa procedura sono riportati nella tabella sottostante (Tabella 1).

Prodotto	Ditta	Codice Prodotto	Conservazione	Utilizzo
Buffer EL	Qiagen	LQG52304 e LQG79217	15-25 °C	Buffer di lisi eritrociti
Buffer RLT	Qiagen	LQG52304	15-25 °C	Soluzione di conservazione
Soluzione fisiologica NaCl 0,9% p/v	Monico	LMC744149066	15-25 °C	Lavaggi
β-mercaptoetanolo	SIGMA	LSGM3148-25ML	2-8 °C	Soluzione di conservazione

Tabella 1: Elenco reagenti con produttore, codice, conservazione e utilizzo.

3.2.2 Estrazione dell'RNA totale

I campioni di buffy coat, dopo scongelamento, vengono sottoposti a lisi meccanica tramite l'utilizzo di un trapano automatico (*TissueRuptor*) al fine di ottenere una sospensione omogenea di colore lattescente.

350 µL di sospensione vengono trasferiti in una provetta sterile alla quale vengono aggiunti 350 µL di etanolo al 70%.

L'etanolo al 70% viene preparato fresco miscelando alcol e acqua RNasi free in proporzione adeguata. Questo viene utilizzato per rimuovere impurità come sali e proteine senza andare però ad intaccare l'RNA, permettendo anche la sua adesione alla membrana di silice durante le successive purificazioni. L'acqua RNasi-free, utilizzata per la preparazione di tale soluzione, è priva di nucleasi, in particolare RNasi, ed è fondamentale per evitare la degradazione dell'RNA durante le varie fasi del protocollo.

Il campione viene trasferito su colonnine di filtrazione fornite dal kit di estrazione. L'utilizzo di queste colonnine consente la purificazione dell'RNA cellulare mediante membrane di silice: l'RNA si lega specificamente alla membrana, lasciando passare i contaminanti nella provetta di raccolta sottostante. A questo punto, viene eseguita una centrifugazione iniziale a 13000 rpm per 15 secondi (short spin) per eliminare l'eluato e preparare la colonnina. Successivamente si procede con i lavaggi necessari alla rimozione degli inibitori della PCR, cationi bivalenti e proteine, mantenendo così RNA puro.

Il primo lavaggio viene effettuato utilizzando il buffer RW1, che viene aggiunto direttamente sulla membrana della colonna. Questo buffer contiene sali di guanidina che rimuovono proteine, lipidi, enzimi e altre impurità organiche.

Dopo centrifugazione a 13000 rpm per 15 secondi, sulla membrana viene aggiunta una miscela di reazione composta da 10 µL di DNasi e 70 µL di buffer RDD. La DNasi I è un enzima endonucleasico che degrada selettivamente il DNA a singolo e doppio filamento, prevenendo la contaminazione dell'RNA, mentre il buffer RDD è necessario per diluire e attivare la DNasi, permettendole di svolgere efficacemente la sua azione.

Dopo un'incubazione a temperatura ambiente per 15 minuti si esegue un ulteriore lavaggio, analogo al precedente, con RW1.

Seguono due lavaggi consecutivi con buffer RPE (500 µL ciascuno). Il buffer RPE contiene etanolo e consente la rimozione di sali residui, proteine e altre impurità dalla membrana della colonna assicurando un'alta purezza dell'RNA eluito.

Infine, l'RNA viene eluito in 40 µL di acqua RNAse-free e conservato in ghiaccio fino al compimento delle fasi successive. Al campione viene aggiunto 1 µL di RNasi Inibitor, una proteina che si lega

alle ribonucleasi endogene (RNasi) inibendone la loro attività, al fine di proteggere l'RNA dalla degradazione e conservarlo in modo stabile per le analisi successive.

I reagenti utilizzati per questa procedura sono riportati nella tabella sottostante (Tabella 2).

Prodotto	Ditta	Codice Prodotto	Conservazione	Utilizzo
Buffer RW1	Qiagen	LQG52304	15-25 °C	Buffer di lavaggio
Buffer RPE	Qiagen	LQG52304	15-25 °C	Buffer di lavaggio
Acqua RNasi-free	Qiagen	LQG52304	15-25 °C	Soluzione con etanolo
Etanolo 70%	Carlo Erba	LCB414601	15-25 °C	Rimuovere le impurità
Buffer RDD	Qiagen	LQG79254	2-8 °C	Degrada il DNA
RNasi Inibitor	Promega	LPON251	-10 °C	Soluzione di conservazione

Tabella 2: Elenco reagenti utilizzati per estrazione RNA con produttore, codice, conservazione e utilizzo.

La completa procedura di estrazione è riassunta e schematizzata nell'immagine che segue (Figura 8).

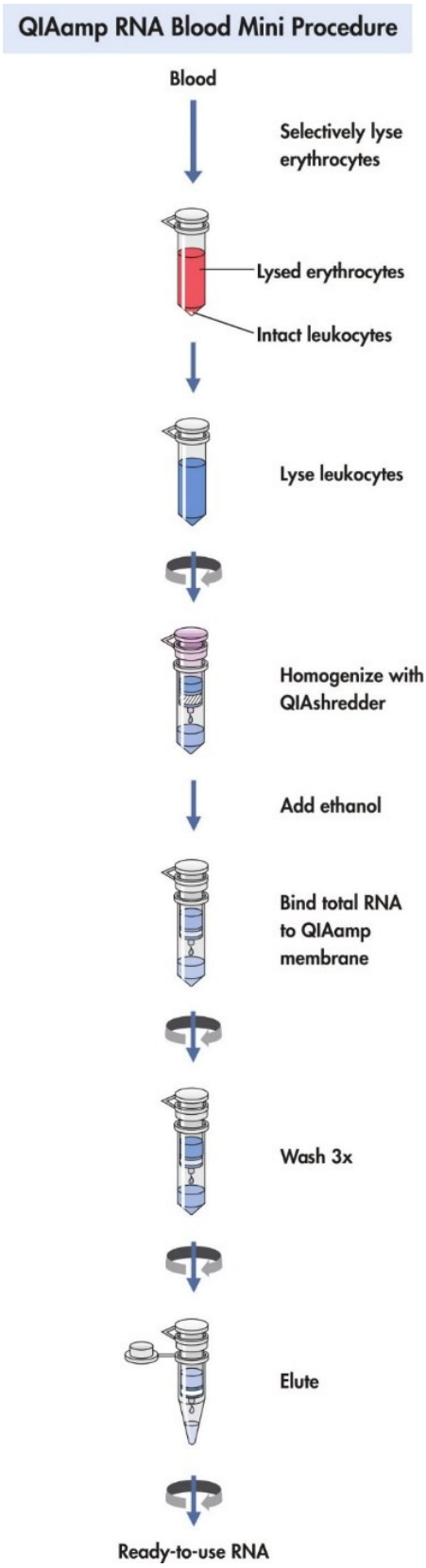

Figura 8: Riassunto schematico della procedura di estrazione di RNA mediante l'utilizzo del kit QIAamp ® RNA Blood Mini (50).[5]

3.2.3 Quantificazione dell'RNA totale

La quantificazione e la valutazione della purezza degli acidi nucleici, sia RNA che DNA, vengono eseguite mediante spettrofotometria utilizzando il dispositivo NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific), uno strumento in grado di analizzare quantità minime di campione (1–2 µL) senza necessità di cuvette aggiuntive.
Il principio di funzionamento si basa sulla misurazione dell'assorbanza della luce ultravioletta (OD) a lunghezze d'onda caratteristiche per ogni acido nucleico. L'assorbanza letta alla lunghezza d'onda di 260 nm restituisce la quantità di acidi nucleici presenti nel campione, l'assorbanza letta a 280 nm indica l'eventuale presenza di proteine, in particolare amminoacidi aromatici come triptofano e tirosina e infine l'assorbanza letta a 230 nm restituisce la presenza di contaminanti organici, quali fenolo, etanolo e sali.

Durante l'analisi, il dispositivo fornisce automaticamente la concentrazione degli acidi nucleici, espressa in ng/µL e calcola i rapporti $OD_{260/280}$ e $OD_{260/230}$, che rappresentano rispettivamente indicatori della purezza rispetto a eventuale contaminazione.
Il rapporto OD_{260}/OD_{280} e il rapporto OD_{260}/OD_{230} dovrebbero essere pari o superiori a 1,8. Tali valori di assorbanza sono considerati idonei per le successive analisi molecolari.
Questa fase di quantificazione e di valutazione delle eventuali contaminazioni permette di confermare l'adeguatezza dei campioni per le fasi successive dell'analisi, garantendo la qualità e l'idonea quantità dell'acido nucleico isolato.

3.2.4 Amplificazione e Rilevazione del trascritto *BCR-ABL1*

Prima di procedere con la fase di amplificazione e di rilevazione degli acidi nucleici viene eseguita una diluzione di ogni campione in esame in modo tale da partire dalla medesima concentrazione di acido nucleico; per l'analisi del trascritto i campioni vengono diluiti a una concentrazione finale di 40 ng/µL in acqua RNAse-free (fornita dal kit di estrazione utilizzato).
L'analisi del trascritto *BCR-ABL1* avviene utilizzando la metodica RT-Real Time PCR quantitativa (RT-qPCR).
Il kit marcato CE-IVD utilizzato è **RealQuality Rq-BCR-ABL p210 One-Step** [AB Analitica REF RQ-105-96], nel quale sono presenti gli standard RealQuality Rq-BCR-ABL p210 Standard e il controllo positivo BCR-ABL p210 Reference. I reagenti del kit vengono conservati a -20 °C mentre gli standard e il controllo positivo a -80 °C.
Ogni campione viene analizzato in duplicato, sia per il trascritto di fusione *BCR-ABL1* sia per il gene di controllo ABL1, il quale costituisce un riferimento per la quantificazione e la normalizzazione del trascritto di interesse rispetto al numero di trascritti del gene housekeeping, oltre a consentire la

valutazione dell'idoneità dell'RNA estratto e l'eventuale presenza di inibitori nella reazione di PCR per individuare eventuali falsi negativi.

Ad ogni seduta di analisi vengono preparate due miscele di reazione distinte, una per la retrotrascrizione e per l'amplificazione della traslocazione t(9;22) (p210 *BCR-ABL1*) e una per la retrotrascrizione e per l'amplificazione del gene di controllo ABL1 (Figura 9).

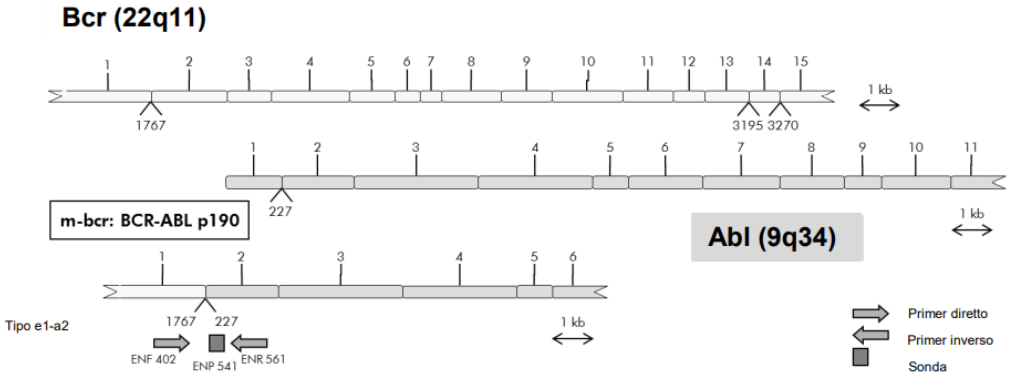

Figura 9: Rappresentazione schematica del trascritto *BCR-ABL1* M-bcr coperto dal set di primer e sonda qPCR forniti dal kit utilizzati.[5]

Questo permette di ottenere da ciascuna reazione l'efficienza massima che altrimenti sarebbe stata inficiata dall'utilizzo di una strategia multiplex, cioè dall'amplificazione e dalla rilevazione simultanea di entrambi i trascritti in una medesima reazione.
Le mix vengono preparate in tubi Eppendorf da 2 mL con i seguenti volumi per campione:

Mix *BCR-ABL1*	1x (µL)
qPCR Mix One-Step	12.5
BCR-ABL p210 One-Step Oligomix	7.5
Volume finale	20.0

Mix ABL1	1x (µL)
qPCR Mix One-Step	12.5
ABL One-Step Oligomix	7.5
Volume finale	20.0

Tabelle 3 e 4: Volumi dei reagenti necessari per eseguire l'RT-qPCR

Queste miscele enzimatiche sono fondamentali per l'esecuzione delle reazioni poiché contengono:

- DNA polimerasi Taq (termoresistente e con attività esonucleasica 5'→3');
- Trascrittasi inversa;
- dNTPs;

- Primer specifici (diretto e inverso);
- Sonda oligonucleotidica marcata;
- Buffer di reazione;
- $MgCl_2$.

Successivamente, sotto cappa a flusso laminare vengono dispensati 20 µL di ciascuna miscela nei rispettivi pozzetti della piastra da 96, come descritto nella figura 5, ai quali vengono aggiunti 5 µL di RNA.

All'interno della stessa seduta analitica sono inclusi gli standard di calibrazione per la costruzione della curva standard (S1/S6), un controllo positivo costituito da RNA reference (REF) e un controllo negativo contenente solo acqua RNAse-free (C NEG), per escludere eventuali contaminazioni. Tra gli standard e il Reference vengono inseriti in doppio i campioni (C1/C16), fino ad un massimo di 16.

La piastra rispetta il seguente schema grafico:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	S2	S2	S3	S3	S4	S4	S5	S5	S6	S6
B	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	C5	C5	C6	C6
C	C7	C7	C8	C8	C9	C9	C10	C10	C11	C11	C12	C12
D	C13	C13	C14	C14	C15	C15	C16	C16		REF	REF	CN
E			S2	S2	S3	S3	S4	S4	S5	S5	S6	S6
F	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	C5	C5	C6	C6
G	C7	C7	C8	C8	C9	C9	C10	C10	C11	C11	C12	C12
H	C13	C13	C14	C14	C15	C15	C16	C16		REF	REF	CN

Tabella 5: Rappresentazione piastra di amplificazione. Nella porzione superiore della piastra (in rosso) viene analizzata la presenza del trascritto di fusione *BCR-ABL1* mentre nella porzione inferiore è viene analizzata la presenza del trascritto del gene di controllo ABL1.

Gli standard inseriti consentono la costruzione della retta di quantificazione che consente la quantificazione del numero di trascritti M-bcr e di ABL1 presenti nei campioni.
I cinque punti standard contenuti nel kit sono costituiti da diluizioni seriali, a partire da 10^2 copie/reazione, di un plasmide contenente sia la sequenza del gene target *BCR-ABL1* p210 sia quella di ABL1. Vengono utilizzati gli stessi punti standard in associazione con le due mix di retrotrascrizione e amplificazione per costruire le retta standard di entrambi i trascritti.

La piastra, una volta aggiunti tutti i componenti, viene sigillata con pellicola trasparente, centrifugata a 1000 rpm per un minuto per eliminare eventuali bolle d'aria e garantire l'adesione dei reagenti sul fondo dei pozzetti ed inserita nello strumento Applied Biosystems 7500 Fast DX (Life Technologies) per l'amplificazione. Questo strumento è un termociclatore per PCR Real Time con un sistema di rilevamento della fluorescenza per uso diagnostico in vitro.
Essendo separati in due reazioni distinte, entrambi i target vengono riconosciuti con il medesimo fluoroforo FAM, secondo le indicazioni riportate sul manuale d'uso del kit utilizzato.

Il profilo termico utilizzato è indicato in Tabella 6:

Modalità di analisi	Temperatura	Durata	n. cicli
Mantenimento	50°	2 minuti	1
Mantenimento 2	95°	10 minuti	1
Ciclizzazione	95°	15 secondi	50
	60°	1 minuto con acquisizione della fluorescenza FAM; quencer: TAMRA	

Tabella 6: Profilo termico della reazione di RT-qPCR

I reagenti utilizzati per questa procedura sono riportati nella tabella 7.

Prodotto	Ditta	Codice	Conservazione	Utilizzo
QPCR Mix One-Step	AB ANALITICA	LANRQ-105-6M	-30/-20 °C	Miscela enzimatica per retrotrascrizione qPCR.
BCR-ABL p210 One-Step Oligomix	AB ANALITICA	LANRQ-105-6M	-30/-20 °C	Oligomix con primer e sonda per *BCR-ABL1* p210
ABL One-Step Oligomix	AB ANALITICA	LANRQ-105-6M	-30/-20 °C	Oligomix con primer e sonda per gene housekeeping ABL1.
BCR-ABL p210 REFERENCE	AB ANALITICA	LAN05-64-06	-85/-75 °C	Controllo positivo
REAL QUALITY RQ BCR-ABL p210 STANDARD	AB ANALITICA	LANRQ-54-SM	-30/-20 °C	Standard a concentrazione nota per curva standard

Tabella 7: Reagenti AB ANALITICA per RT-qPCR *BCR-ABL1* p210: codici, conservazione e utilizzo.

3.2.5 Criteri interpretativi *BCR-ABL1*

Nel caso specifico della traslocazione *BCR-ABL1*, durante la PCR la fluorescenza generata dalla sonda TaqMan permette di monitorare in tempo reale l'amplificazione del cDNA bersaglio in tutte le fasi della reazione. La rilevazione di tale fluorescenza ad ogni ciclo genera una curva sigmoidale che ricalca l'aumento esponenziale del numero di copie dell'amplificato. Nelle fasi iniziali della reazione questa curva tenderà ad avere una fluorescenza bassa a causa del basso numero di copie generato. Questa parte iniziale di bassa fluorescenza viene detto segnale di fondo o background. L'incremento esponenziale del numero di copie permette l'incremento esponenziale del segnale di fluorescenza.

Il ciclo al quale è possibile discriminare il segnale di fluorescenza dal rumore di fondo viene definito come ciclo soglia o ciclo threshold (Ct), in corrispondenza del punto in cui la curva supera una linea di soglia arbitraria ma costante, tracciata sopra il livello del background. Tale linea consente di identificare il momento in cui l'amplificazione diventa rilevabile in modo significativo (Figura 10).

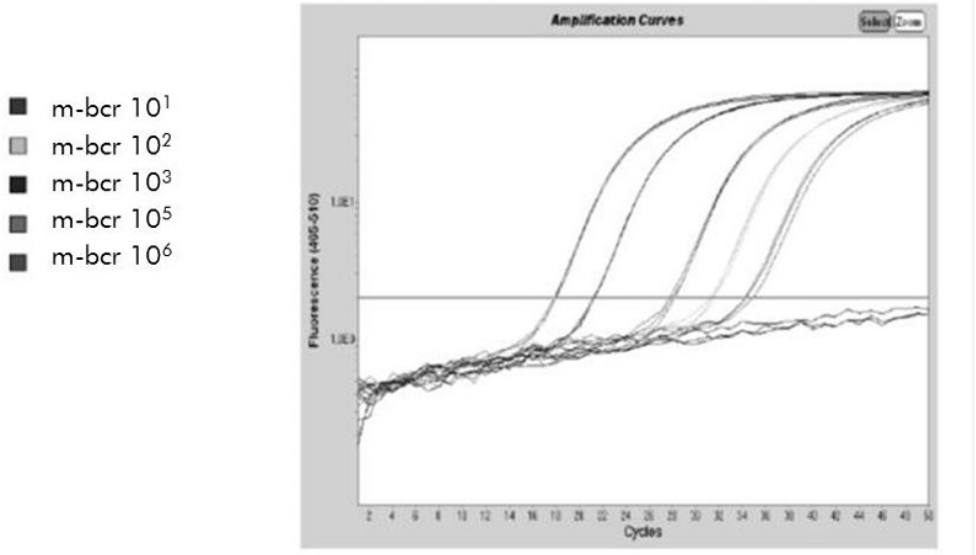

Figura 10: Curva di amplificazione degli standard *BCR-ABL1*, nell'immagine è presente la linea di Threshold.[5]

Questo valore è inversamente proporzionale alla quantità iniziale di materiale genetico target presente nel campione: a parità di condizioni di amplificazione, maggiore è la quantità di acido nucleico target contenuto nel campione analizzato, maggiore è la quantità di prodotto sviluppato e più basso sarà il numero di cicli necessario a far aumentare la fluorescenza.

Per determinare con precisione la quantità assoluta di DNA bersaglio vengono generate curve standard utilizzando gli standard che erano stati precedentemente inseriti nella piastra. Questi standard presentano diluizioni seriali (tipicamente diluizioni 1:10) di un campione contenente il target in concentrazione nota.

Per questa analisi vengono utilizzati sei punti della curva standard, corrispondenti a concentrazioni note del trascritto *BCR-ABL1* p210 espresse come numero di copie per 5 µL: 10, 100, 1000, 10.000, 100.000 e 1.000.000. L'amplificazione di queste diluizioni seriali produrrà una serie di curve con relativo Ct. Riportando in grafico il valore di Ct in funzione delle concentrazioni si otterrà una retta, definita retta standard, inserendo sull'asse delle x il logaritmo in base 10 del numero di copie di DNA presenti e sull'asse delle y il corrispondente valore di Ct (Figura 11). La successiva interpolazione in questa retta dei Ct ottenuti per ogni campione non noto consentirà di ricavarne la concentrazione.

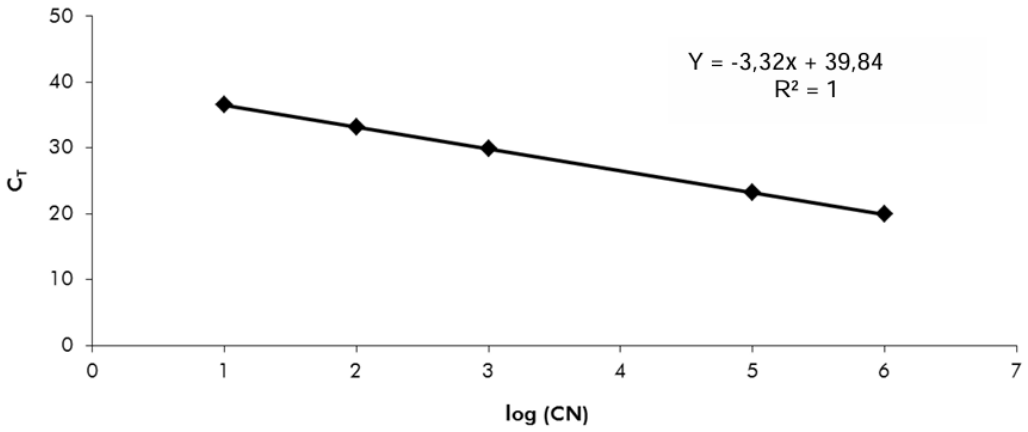

Figura 11: Curva teorica calcolata con 5 diluizioni standard. Si calcola una curva di regressione lineare (y = mx + q) per ogni gene (ABL1 e *BCR-ABL1*), dove m è la pendenza della linea (anche chiamata slope) e q è l'intercetta y, ossia la coordinata y del punto in cui la linea attraversa l'asse y. La relativa equazione e il coefficiente di determinazione (R^2) sono riportati nel grafico.[5]

Il valore di Ct può quindi essere usato per determinare la concentrazione del target presente nel campione mediante analisi della curva standard. Per calcolare l'input generato da un campione sconosciuto viene utilizzata un'equazione di regressione lineare della curva standard (equazione della retta).

La relazione lineare tra Ct e quantità di target è definita dall'equazione canonica di una retta in assi cartesiani:

$$y = mx + q$$

Dove: y è il valore di Ct, m è la pendenza della retta (slope), x è il logaritmo in base 10 della concentrazione del target ignoto e q è l'intercetta (punto dove la retta interseca l'asse delle y).
Conoscendo il valore di Ct, l'equazione può essere riorganizzata per determinare la quantità di acido nucleico:

$$X = \frac{y - q}{m}$$

Per verificare l'affidabilità della retta standard, il software calcola il coefficiente di correlazione R^2 che esprime quanto i dati sperimentali si adattano alla regressione lineare tra log del numero di copie e valore Ct. Un R^2 superiore a 0,95 è considerato accettabile, mentre valori oltre 0,98 indicano un'ottima precisione nella quantificazione.

Vengono inoltre calcolati la slope e l'intercetta. La slope descrive l'efficienza di amplificazione, ideale intorno a –3,32 (pari a un'efficienza del 100%), mentre l'intercetta corrisponde al Ct atteso in presenza di una singola copia (log = 0). La pendenza teorica della curva standard è circa –3,3; valori compresi tra –3,0 e –3,9 sono ritenuti accettabili, purché il coefficiente di correlazione sia maggiore di 0,95.

Partendo dalla curva standard è possibile ricavare l'efficienza della reazione di amplificazione. Il valore ottenuto indica quanto efficacemente il target viene raddoppiato a ogni ciclo.

Dopo aver trovato le equazioni di calibrazione, per ciascun campione viene calcolato il rapporto tra il numero di copie del trascritto di interesse *BCR-ABL1* e il trascritto di riferimento ABL1 a partire dai rispettivi valori di Ct. Per ridurre le variazioni tecniche legate all'estrazione e alla quantità di RNA utilizzato, è stato calcolato il numero di copie normalizzato (NCN) con la seguente formula:

$$NCN = \frac{BCR - ABL1\ CN}{ABL\ CN}\ x\ 100$$

Dove: *BCR-ABL1* CN è il numero di copie del gene *BCR-ABL1* calcolato partendo dal Ct e ABL CN è il numero di copie del gene di riferimento ABL1 calcolato sempre partendo dal Ct.

Infine, per valutare la quantità di malattia minima residua (MRD) nei campioni di follow-up, rispetto a quelli diagnostici, viene calcolato il rapporto tra i valori normalizzati di *BCR-ABL1* misurati in questi due momenti, utilizzando la seguente formula:

$$MRD = \frac{\left(\frac{BCR - ABL1\ CN}{ABL1\ CN}\right) follow\ up}{\left(\frac{BCR - ABL1\ CN}{ABL1\ CN}\right) diagnosi}$$

Nella validazione della seduta è necessario applicare rigorosi controllo di qualità. Campioni con un numero di copie del gene di riferimento ABL1 inferiore a 1318 sono considerati non affidabili e

scartati; la variazione tra replicati deve mantenersi entro una differenza di Ct inferiore a 2 per garantire la riproducibilità; i controlli negativi (acqua) sono inclusi per monitorare eventuali contaminazioni.

3.3 Analisi quantitativa della mutazione V617F del gene *JAK2*

3.3.1 Estrazione del DNA genomico

Per l'analisi della mutazione V617F del gene *JAK2* vengono utilizzati campioni di sangue intero raccolto in provette sterili da 3 mL contenenti come anticoagulante K_2EDTA

Il DNA genomico viene estratto con procedura automatizzata mediante piattaforma Galaxy DM46STR (Hamilton) utilizzando il kit **Elite Galaxy ® 300 Extraction kit** [ELITechGroup, REF INT021EX].

L'estrazione si basa sulla tecnologia delle biglie magnetiche (beads), le quali sono rivestite da un sottile strato di silice che consente di legare in modo reversibile gli acidi nucleici e di separarli efficacemente dai contaminanti presenti nei campioni, garantendo così un'elevata purezza del materiale genetico ottenuto. Il kit include i seguenti componenti principali, riportati in Tabella 8.

Componente	Funzione principale
Proteinasi K (PK)	Digestione proteica e lisi cellulare
PK Buffer	Ricostituzione Proteinasi K
Magnetic Beads	Legame degli acidi nucleici
Carrier RNA	Migliora il recupero degli acidi nucleici
Carrier Buffer	Ricostituzione Carrier RNA
Lysis Buffer	Lisi cellulare e rilascio acidi nucleici
Binding Buffer 1	Favorisce il legame acidi nucleici–biglie
Wash Buffer 2	Rimozione di contaminanti e sali
Wash Buffer 3	Lavaggio finale
Elution Buffer	Rilascio degli acidi nucleici purificati

Tabella 8: Componenti dell'ELITe GALAXY 300 Extraction Kit.

Il protocollo di estrazione automatizzata prevede, in una prima fase, la lisi dei campioni, ottenuta trattando il materiale biologico, 300 µL di sangue intero, con 120 µL Lysis Buffer e 30 µL di Proteinasi K, allo scopo di rompere le cellule e liberare gli acidi nucleici. In questa fase viene inoltre aggiunto 15 µL di Carrier RNA (liofilo, viene ricostituito con 450 µL del suo buffer), che migliora il recupero degli acidi nucleici soprattutto nei campioni con basso contenuto di target. Successivamente, al lisato vengono aggiunti 25 µL di Magnetic Beads e 450 µL di Binding Buffer1, permettendo agli

acidi nucleici di legarsi alle biglie magnetiche. Lo strumento utilizza un separatore magnetico per raccogliere le biglie e rimuovere il sovranatante contenente componenti indesiderati. Le biglie vengono quindi sottoposte a una serie di lavaggi sequenziali con 800 µL di Wash Buffer 2 (ripetuto due volte), 800 µL di Wash Buffer 4 e 700 µL di Wash Buffer 3, passaggi volti a eliminare sali, inibitori enzimatici e altre sostanze contaminanti. Una fase di asciugatura a 60°C consente di rimuovere completamente eventuali residui di etanolo derivanti dai lavaggi precedenti. Infine, gli acidi nucleici purificati vengono eluati mediante 200 µL di Elution Buffer e raccolti in una piastra dedicata, rendendoli immediatamente disponibili per saggi diagnostici a valle, come Real-Time PCR. L'automazione del processo, combinata con la tecnologia a biglie magnetiche, rende il sistema particolarmente affidabile per l'ottenimento di acidi nucleici ad elevata purezza. Tale approccio contribuisce a ridurre i rischi legati alla manipolazione di campioni potenzialmente infetti e consente di standardizzare la fase di preparazione, garantendo maggiore qualità e riproducibilità nelle analisi diagnostiche a valle.

I reagenti forniti dal kit e utilizzati per l'estrazione elencati in Tabella 9.

Prodotto	Conservazione	Utilizzo
PK Buffer	T. Ambiente	Soluzione tampone per Proteinasi K
PK	T. Ambiente	Enzima Proteinasi K
Magnetic beads	T. Ambiente	Beads magnetiche
Carrier Buffer	T. Ambiente	Soluzione contenente carrier RNA
Lysis Buffer	T. Ambiente	Soluzione per lisi cellulare
Binding Buffer	T. Ambiente	Soluzione per il legame del DNA con le beads magnetiche
Wash Buffer 1	T. Ambiente	Primo tampone di lavaggio per rimuovere i contaminanti.
Wash buffer 2	T. Ambiente	Secondo tampone di lavaggio per migliorare la purezza del DNA.
Elution buffer	T. Ambiente	Soluzione per separare il DNA purificato dalle beads magnetiche.

Tabella 9: Elenco reagenti utilizzati per estrazione automatica di DNA con modalità di conservazione e utilizzo.

Dopo l'estrazione i campioni vengono quantizzati e valutati utilizzando il Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) (vedi paragrafo 3.2.3).
Gli eluati ottenuti vengono conservati a –80 °C fino al momento dell'analisi molecolare.

3.3.2 Quantificazione mutazione V617F del gene *JAK2*

Prima di procedere con la fase di amplificazione e di rilevazione degli acidi nucleici, viene eseguita una diluzione di ogni campione in esame in modo tale da partire dalla medesima concentrazione di acido nucleico; per l'analisi della mutazione V617F del gene *JAK2* i DNA vengono diluiti a una concentrazione di 5 ng/ µL in tampone 1xTE con pH 8,0.

L'amplificazione dei campioni per la rilevazione della mutazione V617F di *JAK2* viene eseguita con metodica Real Time PCR quantitativa utilizzando lo strumento Applied Biosystems 7500 Fast DX (Life Technologies). Tutta la procedura viene condotta in area dedicata alla preparazione delle miscele di amplificazione, impiegando esclusivamente materiali e strumenti RNAse/DNAse-free e monouso per evitare contaminazioni.

Il kit utilizzato per questa analisi è **Ipsogen ® *JAK2* MutaQuant** [Qiagen, REF 673512], un test quantitativo in vitro per la rilevazione e quantificazione accurate dell'allele *JAK2* V617F/G1849T a partire da DNA genomico estratto da sangue periferico di pazienti con sospetta neoplasia MPN. Questo test, che utilizza la tecnologia TaqMan, permette non solo di rilevare la presenza del polimorfismo *JAK2* V617F, ma anche di determinare quantitativamente la percentuale di alleli mutati sul totale degli alleli rilevati. Vengono infatti utilizzati primer specifici sia per l'allele wild-type sia per quello mutato (V617F) (Figura 12).

Grazie a questa configurazione, il sistema permette una discriminazione altamente accurata tra alleli, garantendo elevata sensibilità, specificità e riproducibilità, requisiti fondamentali nelle analisi molecolari di tipo diagnostico.

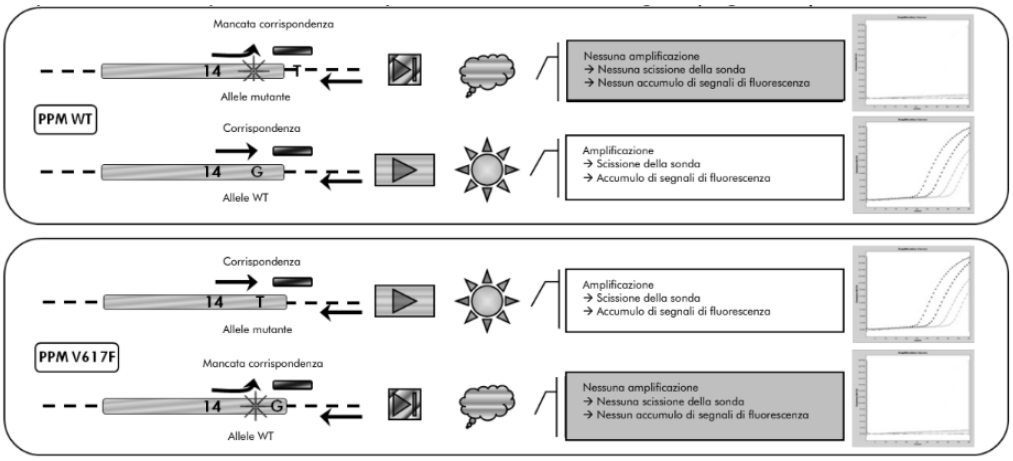

Figura 12: PCR allele-specifica. L'utilizzo della miscela di primer wild-type o V617F e sonda consente la rilevazione specifica dell'allele wild-type o mutato in due reazioni separate condotte utilizzando lo stesso campione. I risultati sono espressi come percentuale di copie V617F tra tutte le copie *JAK2*.[6]

Prima dell'avvio dell'analisi, i reagenti necessari forniti dal kit e conservati a -20°C, vengono scongelati a temperatura ambiente, omogeneizzati tramite inversione e centrifugati brevemente. La preparazione delle mix viene eseguita in ghiaccio.

Per ciascun campione e controllo viene preparata una miscela di amplificazione specifica (Amp-Mix), distinta per l'analisi della variante *JAK2* V617F e per l'allele wild-type (WT).

Le miscele sono state allestite secondo i volumi riportati nelle Tabelle 11 e 12:

PREMISCELA V617F	
Amp-Mix	Volume per 1 reazione (µL)
PCR Master Mix	12,5
Miscela di primers e sonda	1
Acqua	6,5
Campione di DNA	5 (25ng)
Volume totale	25

Tabella 11: Composizione della premiscela V617F per reazione qPCR, con volumi dei componenti espressi in microlitri (µL).

PREMISCELA WT	
Amp-Mix	Volume per 1 reazione (µL)
PCR Master Mix	12,5
Miscela di primers e sonda	1
Acqua	6,5
Campione di DNA	5 (25ng)
Volume totale	25

Tabella 12: Composizione della premiscela WT per reazione qPCR, con volumi dei componenti espressi in microlitri(µL).

Le premiscele sono distribuite in aliquote da 20 µL nei rispettivi pozzetti di una piastra da 96 (come indicato nella tabella 14). Successivamente vengono aggiunti 5 µL (25 ng) di DNA da quantificare in ciascun pozzetto, ottenendo un volume finale di 25 µL per reazione.
La piastra viene poi sigillata, centrifugata brevemente per rimuovere bolle d'aria e assicurare il corretto posizionamento del contenuto, quindi inserita nel termociclatore ABI 7500 Fast DX per l'esecuzione dell'amplificazione con il profilo termico indicato in Tabella 13:

Modalità di analisi	Curva standard-quantificazione assoluta	Durata	n. cicli
Mantenimento	Temperatura: 50°	2 minuti	1
Mantenimento 2	Temperatura: 95°	10 minuti	1
Ciclizzazione	Temperatura: 95°	15 secondi	50
	Temperatura: 63°	1 minuto e 30 secondi con acquisizione della fluorescenza FAM	

Tabella 13: Profilo termico della reazione di qPCR

Ogni analisi, oltre ai campioni clinici (S1-S8) caricati in doppio per garantire l'affidabilità dei dati, deve includere un controllo negativo di reazione (mix + acqua) necessario per verificare l'assenza di contaminazioni e di aspecifici nella miscela (H2O), due controlli positivi di amplificazione contenenti uno DNA sintetico con il genotipo mutato per la mutazione in esame (PC VF) e uno DNA sintetico con il genotipo wild type (NC VF), utili a confermare il corretto funzionamento del sistema.
Vengono inseriti in doppio gli standard contenenti sequenza sintetiche dell'allele mutato (M1-M4) e dell'allele wild-type (WT1-WT4) preparati in diluizioni scalari decimali a partire da 10^1 fino a 10^4 copie/µL] (o equivalente in ng/µL).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC VF	PC VF	NC VF	NC VF	M1 50	M1 50	M2 500	M2 500	M3 5000	M3 5000	M4 50000	M4 50000
B	H2O	H2O	S1	S1	S2	S2	S3	S3	S4	S4	S5	S5
C	S6	S6	S7	S7	S8	S8						
D												
E	PC VF	PC VF	NC VF	NC VF	WT1 50	WT1 50	WT2 500	WT2 500	WT3 5000	WT3 5000	WT4 50000	WT4 50000
F	H2O	H2O	S1	S1	S2	S2	S3	S3	S4	S4	S5	S5
G	S6	S6	S7	S7	S8	S8						
H												

Tabella 14: Rappresentazione piastra di amplificazione. Nella porzione superiore della piastra (in rosso) viene analizzata la presenza dell'allele mutato *JAK2* V617F mentre nella porzione inferiore viene analizzata la presenza dell'allele wild type.

I reagenti utilizzati per la reazione di amplificazione e presenti nel kit "**Ipsogen *JAK2* MutaQuant**" sono elencati nella tabella 15.

Prodotto	Codice Prodotto	Conservazione	Utilizzo
V617F controllo positivo	PC-VF-*JAK2* Mini	-22/-18 °C	Controllo positivo
V617F controllo negativo	NC-VF-*JAK2* Mini	-22/-18 °C	Controllo negativo
M1/M2/M3/M4-VF diluizione standard (50/500/5000/50000 copie)	M1/M2/M3/M4 VF Mini	-22/-18 °C	Standard curva di calibrazione
WT-1/2/3/4 diluizione standard (50/500/5000/50000 copie)	WT 1/2/3/4 Mini	-22/-18 °C	Standard curva di calibrazione
Miscela di primers e sonda *JAK2* WT	PPM-*JAK2* WT Mini 25X	-22/-18 °C	Mix PCR
Miscela di primers e sonda *JAK2* V617F	PPM-*JAK2* V617F Mini 25X	-22/-18 °C	Mix PCR

Tabella 15: Reagenti utilizzati nella reazione di amplificazione inclusi nel kit *Ipsogen JAK2 MutaQuant*, con indicazione del codice prodotto, condizioni di conservazione e utilizzo specifico di ciascun componente.

Nella preparazione delle reazioni di amplificazione sono stati impiegati diversi reagenti, necessari a completare la miscela e a garantire il corretto svolgimento della PCR in tempo reale. La base della reazione era costituita dal **TaqMan® Universal PCR Master Mix** (Applied Biosystems), che fornisce i componenti essenziali come DNA polimerasi, dNTPs, $MgCl_2$ e buffer di reazione. Questo mix, tuttavia, non include primer e sonde specifiche, i quali sono stati forniti separatamente dal kit **Mutaquant®** (Qiagen).

3.3.3 Criteri interpretativi V617F *JAK2*

Dalla reazione di qPCR e dall'utilizzo del relativo software vengono ricavati i valori del ciclo soglia (Ct), ovvero il ciclo della Real Time PCR in cui la fluorescenza del segnale supera per la prima volta il livello di fondo e diventa rilevabile, indicando l'inizio della fase esponenziale dell'amplificazione. Tali valori vengono importati in un foglio Excel già preimpostato per tale analisi.

Le curve standard per la variante V617F e per l'allele wild type sono generate tracciando la media dei Ct di ogni punto in funzione del logaritmo in base 10 del numero di copie (CN) presenti in 5 µl di campione standard, secondo l'equazione:

$$y = Media\ Ct; x = log_{10}CN$$

dove CN rappresenta il numero di copie per ciascuno standard (ad esempio, 5×10^1, 5×10^2, 5×10^3 e 5×10^4 copie).

Questa trasformazione è necessaria perché la PCR è un processo esponenziale e la relazione tra Ct e numero di copie è lineare solo se si considera il logaritmo delle copie.

Si ottengono quindi le curve standard sia per gli standard wild-type che per quelli V617F (Figura 13 per il mutato). Tali curve rappresentano rispettivamente l'andamento dell'amplificazione nei diversi standard e la relazione lineare tra il Ct medio e il logaritmo del numero di copie.

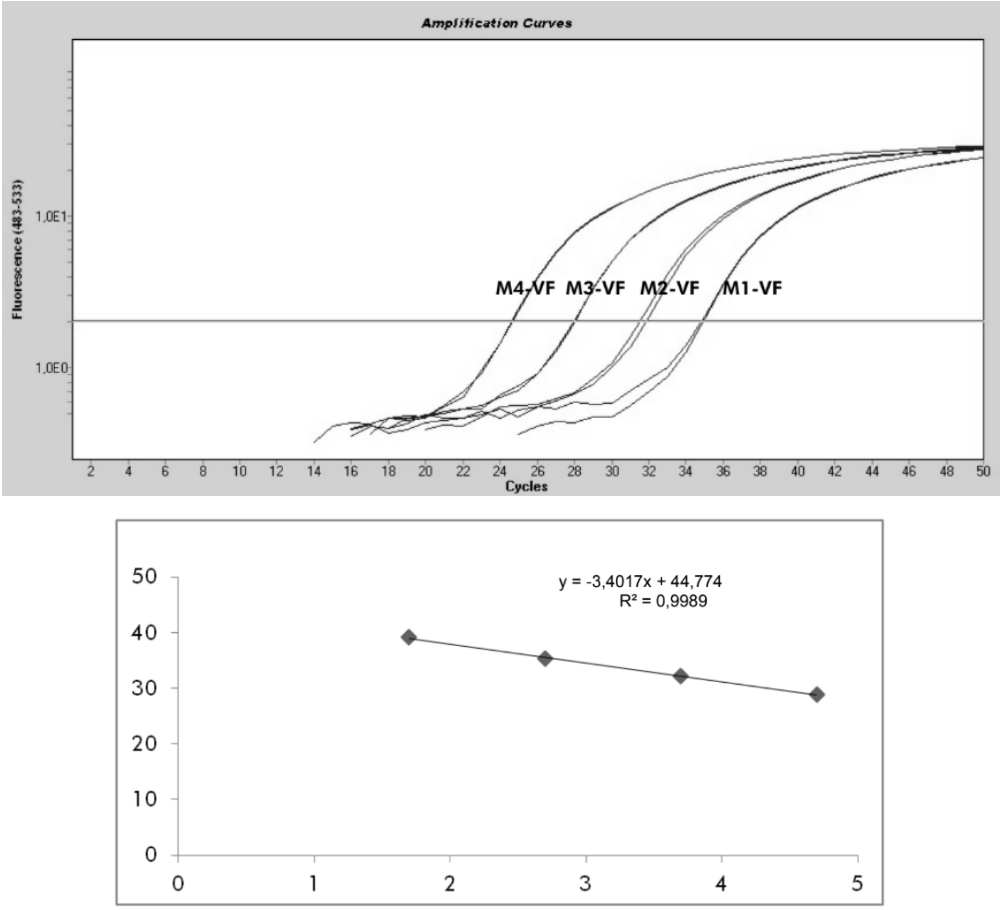

Figura 13: Diagramma di amplificazione delle copie 5 x 10^1, 5 x 10^2, 5 x 10^3 e 5 x 10^4 del plasmide *JAK2* V617F (rispettivamente controlli M1-VF, M2-VF, M3-VF e M4-VF); Curva standard per *JAK2* V617F.[6]

Analogamente a quanto descritto per l'analisi *BCR-ABL1*, viene calcolato il coefficiente di determinazione R^2 e la pendenza della retta (slope) che è utilizzata per calcolare l'efficienza di amplificazione della reazione di PCR.

Le equazioni derivate dalle curve standard sono utilizzate per convertire la media dei valori grezzi Ct dei campioni ignoti in numeri di copie log_{10} di *JAK2* V617F (CN_{V617F}) e wild-type (CN_{WT}), utilizzando le seguenti formule:

$$log_{10}\, CN_{V617F} = \frac{(Media\ Ct_{V617F} - Intercetta\ curva\ standard_{V617F})}{Pendenza\ curva\ standard_{V617F}}$$

$$log_{10}\, CN_{WT} = \frac{(Media\ Ct_{WT} - \ Intercetta\ curva\ standard_{WT})}{Pendenza\ curva\ standard_{WT}}$$

I risultati ottenuti si riferiscono a 25 ng di DNA genomico totale e devono essere espressi come percentuale di *JAK2* V617F. Calcolando il rapporto tra il numero di copie V617F e la somma delle copie V617F e wild-type, moltiplicato per 100.
La formula utilizzata è la seguente:

$$JAK2\ V617F\ \% = \frac{CN_{V617F}}{(CN_{V617F} + \ CN_{WT})} \times\ 100$$

La riproducibilità dei dati viene garantita mediante l'analisi di duplicati con valori di Ct coerenti.
Sono inclusi controlli positivi (PC-VF), attesi con percentuali di allele V617F superiori al 99,9%, e controlli negativi (NC-VF), con percentuali di allele V617F inferiori allo 0,1%, per assicurare la correttezza dell'analisi. A completamento del controllo di qualità, un bianco (mix + acqua) viene utilizzato per monitorare eventuali contaminazioni; in assenza di queste, i valori di copie devono risultare pari a zero.

3.4 Controlli di qualità e tracciabilità

Per garantire l'affidabilità e la riproducibilità dei dati ottenuti dalle analisi molecolari, durante tutte le fasi del processo diagnostico trattate nelle sezioni precedenti, sono stati applicati specifici controlli di qualità pre-analitici, analitici, post-analitici e misure di tracciabilità dei campioni.

3.4.1 Controlli pre-analitici

Tutti i campioni utilizzati per le analisi trattate devono giungere in laboratorio in provette K_2-EDTA da 3 mL, identificati tramite etichetta con codice a barre univoco. I campioni che saranno processati per l'estrazione dell'RNA sono conservati a +4°C per un massimo di 24 ore, mentre i campioni a cui seguirà l'estrazione del DNA sono conservati a +4°C per un massimo di 72 ore. Durante tutte le fasi di lavorazione il personale dedicato è tenuto ad utilizzare materiale sterile monouso e a lavorare nelle aree designate al fine di evitare contaminazioni crociate.

3.4.2 Controlli durante l'estrazione

Durante la fase di estrazione degli acidi nucleici, vengono applicati controlli specifici per valutare la resa e la purezza dei campioni.

Prima di procedere con la fase di amplificazione, sia i campioni di RNA (per *BCR-ABL1*) che quelli di DNA (per *JAK2*) vengono quantificati mediante spettrofotometria in maniera tale da verificare che le fasi di estrazione degli acidi nucleici siano avvenute correttamente. La quantificazione permette di valutare la presenza di eventuali contaminanti proteici o alcolici dovuti dai reagenti utilizzati durante l'estrazione.

3.4.3 Controlli durante la fase di amplificazione

L'accuratezza della fase di amplificazione viene garantita mediante l'inclusione sistematica di controlli in ogni corsa analitica. Per ciascun target molecolare, come già anticipato nelle sezioni precedenti, i campioni clinici vengono caricati in doppio in modo da assicurare la riproducibilità dei risultati.

In ogni piastra da 96 pozzetti vengono inclusi controlli dei quali è noto a priori il risultato atteso.

Il controllo positivo, composto da RNA o DNA di riferimento contenente la mutazione nota, deve essere rilevato ad ogni seduta analitica. Il controllo negativo o bianco contenente tutti i reagenti, primers e sonde necessarie dove il DNA templato viene sostituito da acqua RNAse-free e DNAse-free non deve produrre nessuna curva di amplificazione: questo permette di rilevare un'eventuale contaminazione dei reagenti utilizzati.

Il controllo interno è composto da acidi nucleici (RNA o DNA) ben caratterizzati, come il trascritto del gene housekeeping ABL1 o l'allele wild-type di *JAK2*. La presenza di questo controllo garantisce che la reazione di PCR sia avvenuta in ogni campione.

Per il trascritto di fusione *BCR-ABL1*, il protocollo ha seguito le raccomandazioni della International Scale (IS) per garantire la standardizzazione dei risultati.

3.4.4 Controlli post analitici

Al termine dell'amplificazione, i file di output sono analizzati mediante il software dedicato 7500 Fast SDS. Di ogni file output, per ogni campione, bisogna verificare la corretta forma delle curve di amplificazione, l'adeguata impostazione delle threshold di fluorescenza e i rispettivi valori di Ct. . Vanno anche controllate le curve standard e i rispettivi parametri di slope e R^2 e il corretto posizionamento dei campioni sulla curva standard.

3.4.5 Tracciabilità

Per garantire la tracciabilità dei campioni e dei dati ricavati è necessario assicurarsi, prima di iniziare le analisi, che ogni campione sia codificato in maniera univoca con codice a barre. Tutti i campioni devono essere registrati nelle opportune piattaforme (su software EOS o Concerto). Ogni provetta ulteriormente utilizzata, diversa da quella madre con la quale il campione giunge in laboratorio, deve essere o numerata in maniera progressiva e deve essere tracciato il numero al corrispondente codice

del campione di partenza o rietichettata con il medesimo barcode: l'operatore interessato deve assicurarsi di tale corrispondenza ed eventualmente controllare prima di procedere con le analisi successive.
I dati grezzi e i file di output ottenuti devono essere salvati in cartelle di rete protette dove viene eseguito periodicamente un backup.

3.4.6 Controllo delle irregolarità

I tecnici del settore sono interessati nella valutazione dell'idoneità del campione e nella verifica della corretta identificazione dello stesso. Le eventuali non conformità (NC) devono essere annotate nei moduli appositi e i dirigenti del settore devono essere informati in modo tale da poter procedere con le azioni correttive necessarie.

4. RISULTATI

In questa sezione vengono riportati e trattati i risultati ottenuti dalle sedute analitiche delle analisi quantitative per *BCR-ABL1* p210 e per la mutazione V617F del gene *JAK2* eseguite tra gennaio e luglio 2025.

Per elaborare una stima relativa all'imprecisione del metodo verranno analizzati gli aspetti di ripetibilità, per stimare la variabilità delle misurazioni effettuate in condizioni sperimentali identiche e di riproducibilità per verificare la coerenza dei risultati in condizioni differenti. Verrà esaminata l'efficienza del sistema, come parametro complementare utile a confrontare stabilità e robustezza. Infine, saranno inoltre considerati la variabilità legata dall'operatore e al lotto, così da identificare in modo chiaro i fattori che incidono maggiormente sull'accuratezza complessiva del processo.

4.1 Premessa

Nell'analisi dei dati relativi a *BCR-ABL1* e *JAK2*, un aspetto fondamentale è stato quello di impostare in modo corretto i parametri di elaborazione, così da garantire risultati affidabili e confrontabili. Per questo motivo, la soglia di amplificazione (threshold) è stata fissata a 0.1 ΔRn, valore che corrisponde all'inizio della fase esponenziale e che permette di cogliere il segnale reale evitando distorsioni dovute al rumore di fondo. La baseline, invece, è stata stabilita tra i cicli 3 e 15, cioè in quella fase iniziale in cui la fluorescenza non riflette ancora un'amplificazione significativa del DNA.
Il passo successivo è stato quello di verificare la qualità delle sedute analitiche monitorando il controllo negativo (NTC), campione inserito nella piastra preparato senza DNA bersaglio e quindi utile a escludere contaminazioni o segnali spurii. In tutte le sedute di analisi i controlli negativi non hanno mai mostrato segnale di amplificazione, confermando così l'assenza di interferenze e la correttezza della procedura.

4.2 Analisi *BCR-ABL1*

Si riporta innanzitutto l'analisi delle sedute relative al target p210 *BCR-ABL1*.
Le curve di calibrazione generate nelle diverse sedute sperimentali hanno costituito la base per la valutazione della precisione del metodo, considerando sia i valori di Ct degli standard sia i parametri caratteristici delle regressioni lineari (slope, efficienza, intercetta e R^2).
Durante il periodo sopra indicato sono state eseguite 18 sedute per la quantificazione del trascritto.

4.2.1 Valutazione della ripetibilità degli standard

Per valutare la ripetibilità del metodo, ovvero la sua capacità di produrre risultati consistenti nelle stesse condizioni operative, sono stati analizzati i valori di Ct degli standard all'interno di una singola seduta sperimentale.

Le determinazioni degli standard in ciascuna seduta sono state eseguite in doppio, e da queste repliche è stato possibile stimare la ripetibilità del metodo. Per ciascun livello dello standard sono state quindi calcolate media, deviazione standard (DS) e coefficiente di variazione (CV%), indici comunemente utilizzati per quantificare la precisione intra-seduta. L'analisi è stata eseguita sia per la curva di calibrazione di *BCR-ABL1* p210 (Tabella 16), sia per la curva di calibrazione del gene housekeeping ABL1 (Tabella 17). Nei grafici 1 e 2 vengono visualizzati per ogni seduta e per ogni standard l'andamento delle DS.

p210 BCR-ABL1												
Seduta	DS St1	CV% St1	DS St2	CV% St2	DS St3	CV% St3	DS St4	CV% St4	DS St5	CV% St5	DS St6	CV% St6
03/01/2025	0,08	0,24	0,32	1,02	0,75	2,74	0,52	2,15	0,48	2,32	0,46	2,62
16/01/2025	0,93	2,64	0,18	0,57	0,06	0,23	0,66	2,67	0,02	0,10	0,01	0,08
27/01/2025	0,13	0,40	0,16	0,51	0,04	0,13	0,69	2,91	0,38	1,86	0,05	0,28
07/02/2025	0,18	0,52	0,40	1,23	0,02	0,07	0,11	0,42	0,00	0,00	0,08	0,46
17/02/2025	1,04	2,96	0,11	0,34	0,58	2,06	0,15	0,59	0,11	0,52	0,08	0,46
11/03/2025	0,94	2,70	0,40	1,24	0,01	0,05	0,04	0,14	0,06	0,30	0,27	1,46
13/03/2025	0,30	0,84	0,20	0,62	0,02	0,07	0,02	0,08	0,11	0,52	0,17	0,93
21/03/2025	0,30	0,84	0,11	0,35	0,04	0,12	0,02	0,08	0,01	0,07	0,13	0,69
08/04/2025	0,44	1,26	0,03	0,09	0,04	0,13	0,04	0,17	0,08	0,39	0,06	0,34
24/04/2025	0,34	0,96	0,26	0,82	0,14	0,51	0,00	0,00	0,16	0,72	0,05	0,27
02/05/2025	0,10	0,28	0,24	0,75	0,04	0,15	0,00	0,00	0,02	0,10	0,08	0,46
07/05/2025	0,32	0,91	0,04	0,13	0,08	0,30	0,10	0,39	0,34	1,58	0,17	0,92
15/05/2025	0,50	1,43	0,23	0,74	0,01	0,05	0,04	0,14	0,05	0,23	0,03	0,15
29/05/2025	1,22	3,45	0,14	0,44	0,14	0,50	0,35	1,43	0,07	0,33	0,07	0,39
17/06/2025	0,65	1,83	0,40	1,26	0,04	0,12	0,01	0,06	0,04	0,16	0,07	0,38
20/06/2025	0,35	1,02	0,41	1,28	0,01	0,05	0,01	0,03	0,11	0,52	0,07	0,39
27/06/2025	1,23	3,53	0,33	1,09	0,17	0,62	0,04	0,15	0,08	0,37	0,04	0,20
04/07/2025	0,46	1,28	0,04	0,11	0,16	0,55	0,02	0,09	0,01	0,03	0,05	0,27

Tabella 16: Valori assoluti di DS e valori percentuali di CV per ogni standard posto in duplicato all'interno della piastra. St1: Standard 1 (St1: 10^2 copie di *BCR-ABL1*); St2: Standard 2 (St2: 10^3 copie di *BCR-ABL1*); St3: Standard 3 (St3: 10^4 copie di *BCR-ABL1*); St 4: Standard 4 (St4: 10^5 copie di *BCR-ABL1*); St5: Standard 5 (St5: 10^6 copie di *BCR-ABL1*); St6: Standard 6 (St6: 10^7 copie di *BCR-ABL1*).

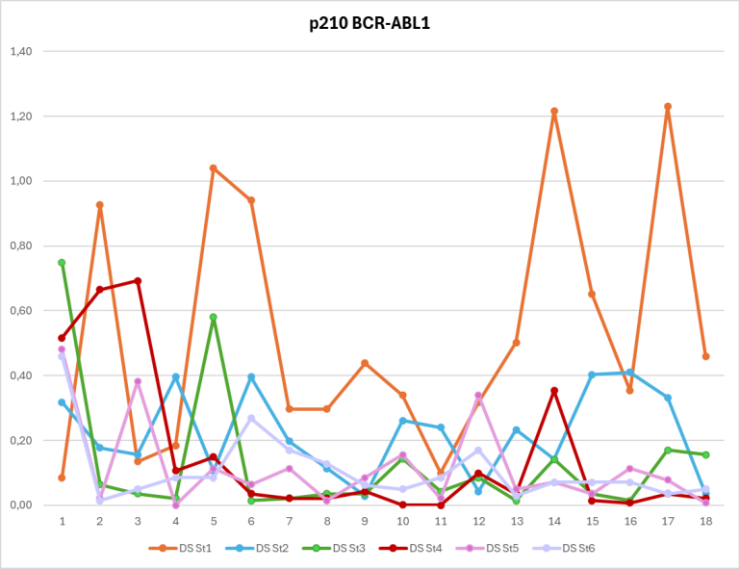

Grafico 1: Rappresentazione grafica dell'andamento delle deviazioni standard (DS) calcolate per ciascuno standard di *BCR-ABL1* p210 (St1–St6) nelle diverse sedute sperimentali (n=18).

Dalle analisi condotte si può evincere che lo standard 1 del trascritto *BCR-ABL1* p210, che rappresenta il punto più basso della curva di calibrazione (cioè quello con minor numero di copie del trascritto p210), mostra la maggiore variabilità di DS nelle diverse sedute rispetto agli altri standard, toccando un valore massimo di DS di 1,20.

ABL1										
Seduta	DS St2	CV% St2	DS St3	CV% St3	DS St4	CV% St4	DS St5	CV% St5	DS St6	CV% St6
03/01/2025	0,06	0,20	0,17	0,60	0,05	0,20	0,04	0,16	0,10	0,54
16/01/2025	0,13	0,47	0,13	0,47	0,01	0,03	0,00	0,01	0,03	0,15
27/01/2025	0,12	0,38	0,10	0,35	0,08	0,34	0,81	3,91	0,08	0,44
07/02/2025	0,40	1,22	0,45	1,54	0,25	0,96	0,15	0,67	0,06	0,30
17/02/2025	0,23	0,69	0,13	0,46	0,79	3,14	0,01	0,06	0,11	0,57
11/03/2025	0,33	1,02	0,06	0,20	0,06	0,25	0,11	0,48	0,11	0,56
13/03/2025	0,15	0,46	0,16	0,54	0,21	0,81	0,11	0,51	0,03	0,15
21/03/2025	0,11	0,32	0,07	0,24	0,07	0,28	0,08	0,35	0,15	0,79
08/04/2025	0,30	0,92	0,17	0,58	0,07	0,27	0,10	0,44	0,02	0,11
24/04/2025	0,18	0,54	0,02	0,07	0,31	1,20	0,10	0,44	0,10	0,52
02/05/2025	0,08	0,26	0,07	0,24	0,06	0,22	0,04	0,19	0,02	0,11
07/05/2025	0,35	1,05	0,21	0,72	0,08	0,33	0,16	0,72	0,06	0,33
15/05/2025	0,65	1,96	0,26	0,90	0,01	0,03	0,12	0,53	0,04	0,18
29/05/2025	0,21	0,65	0,15	0,51	0,04	0,16	0,07	0,32	0,00	0,00
17/06/2025	0,52	1,61	0,15	0,51	0,25	0,98	0,07	0,31	0,05	0,26
20/06/2025	0,12	0,37	0,01	0,05	0,12	0,47	0,01	0,06	0,06	0,33
27/06/2025	0,23	0,74	0,06	0,20	0,11	0,46	0,07	0,33	0,01	0,08
04/07/2025	0,10	0,31	0,54	1,83	0,04	0,14	0,23	1,04	0,57	3,02

Tabella 17: valori assoluti di DS e valori percentuali di CV degli Standard relativi al gene di controllo ABL1.

St2: Standard 2 (St2: 10^3 copie di ABL1); St3: Standard 3 (St3: 10^4 copie di ABL1); St 4: Standard 4 (St4: 10^5 copie di ABL1); St5: Standard 5 (St5: 10^6 copie di ABL1); St6: Standard 6 (St6: 10^7 copie di ABL1).

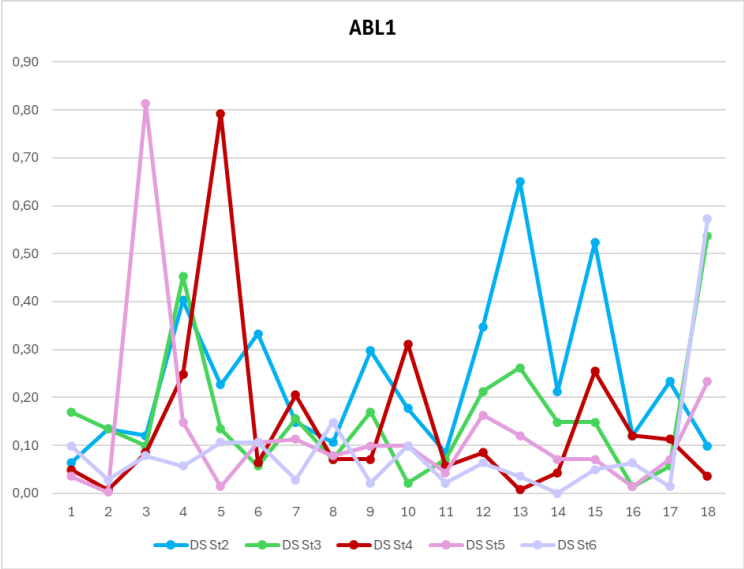

Grafico 2: Rappresentazione grafica delle Deviazioni Standard (DS) calcolate per ciascuno standard di ABL1 (St2–St6) nelle 18 sedute sperimentali.

Le DS del trascritto ABL1 risultano più omogenee e contenute nelle diverse sedute (si arriva ad un valore massimo di 0,80). Si noti che in questo caso manca lo standard 1 perché il numero di copie del trascritto ABL1 è troppo basso per essere rilevato con affidabilità, quindi il punto più basso della curva di calibrazione è rappresentato dal valore 10^3 copie.

4.2.2 Valutazione della riproducibilità degli standard

L'analisi dell'andamento dei valori di Ct dei campioni standard tra sedute sperimentali differenti rappresenta un parametro fondamentale per valutare la riproducibilità del sistema qPCR nel tempo. Sono stati presi in considerazione anche i parametri globali delle curve di calibrazione come slope, intercetta e coefficiente di determinazione R^2, (Tabella 18 per p210 e Tabella 19 per ABL1), oltre ai valori dei singoli Ct degli standard (Tabella 20 e Tabella 21), così da ottenere una visione più completa della stabilità del metodo.

Questa valutazione consente di individuare l'eventuale influenza di fattori tecnici o metodologici che possono introdurre variabilità tra giornate diverse, anche quando le condizioni operative vengono mantenute costanti. In questo modo è stato possibile stimare l'imprecisione complessiva del sistema in condizioni sperimentali realistiche e non limitate alla singola seduta.

p210 BCR-ABL1			
Seduta	Slope	Intercetta	R2
03/01/2025	-3,51	38,25	0,994
16/01/2025	-3,38	38,12	0,996
27/01/2025	-3,29	37,08	0,997
07/02/2025	-3,38	38,77	0,999
17/02/2025	-3,30	38,24	0,995
11/03/2025	-3,33	38,41	0,996
13/03/2025	-3,38	38,58	0,999
21/03/2025	-3,38	38,63	0,999
08/04/2025	-3,29	38,22	0,998
24/04/2025	-3,40	38,70	0,999
02/05/2025	-3,36	38,54	0,998
07/05/2025	-3,32	38,36	0,999
15/05/2025	-3,35	38,41	0,999
29/05/2025	-3,43	38,70	0,995
17/06/2025	-3,45	38,89	0,998
20/06/2025	-3,33	38,21	0,998
27/06/2025	-3,40	37,74	0,993
04/07/2025	-3,44	38,92	0,997
Media	**-3,37**	**38,38**	**0,997**
DS	**0,06**	**0,44**	**0,002**
CV%	**1,78**	**1,15**	**0,19**

Tabella 18: Per ciascuna seduta sperimentale sono riportati i parametri delle curve standard di amplificazione del target p210 *BCR-ABL1* (slope, intercetta e coefficiente di determinazione R^2). In fondo alla tabella sono indicati i valori medi, la deviazione standard (DS) e il coefficiente di variazione (CV%) calcolati sui dati complessivi.

ABL1			
Seduta	Slope	Intercetta	R2
03/01/2025	-3,27	37,99	0,999
16/01/2025	-3,25	38,05	0,999
27/01/2025	-3,55	38,98	0,994
07/02/2025	-3,53	39,94	0,998
17/02/2025	-3,55	39,83	0,995
11/03/2025	-3,45	39,39	0,999
13/03/2025	-3,32	38,71	0,999
21/03/2025	-3,57	40,13	0,999
08/04/2025	-3,31	39,04	0,999
24/04/2025	-3,40	39,57	0,999
02/05/2025	-3,39	39,46	0,999
07/05/2025	-3,40	39,64	0,999
15/05/2025	-3,46	39,86	0,996
29/05/2025	-3,35	39,18	0,999
17/06/2025	-3,30	39,06	0,998
20/06/2025	-3,37	39,25	0,999
27/06/2025	-3,30	38,02	0,999
04/07/2025	-3,24	38,84	0,999
Media	**-3,39**	**39,16**	**0,998**
DS	**0,11**	**0,66**	**0,002**
CV%	**3,19**	**1,67**	**0,16**

Tabella 19: Per ciascuna seduta sperimentale sono riportati i parametri delle curve standard di amplificazione del gene di controllo ABL1 (slope, intercetta e coefficiente di determinazione R^2). In fondo alla tabella sono indicati i valori medi, la deviazione standard (DS) e il coefficiente di variazione (CV%) calcolati sui dati complessivi.

Le curve di calibrazione sia per il trascritto p210 *BCR-ABL1* che per il gene di controllo ABL1 presentano valori medi di slope prossimi al valore ottimale di -3,32 (rispettivamente -3,37 e -3,39), con deviazioni standard contenute e coefficienti di variazione sempre inferiori al 5%.

Questo conferma che le oscillazioni tra le diverse sedute sono limitate e i dati risultano complessivamente stabili. Inoltre, i valori di R^2 si mantengono costantemente superiori a 0,99 in entrambe le analisi, a dimostrazione dell'elevata linearità delle curve di calibrazione e della robustezza del metodo utilizzato.

p210 BCR-ABL1						
Seduta	**Ct St1 Media**	**Ct St2 Media**	**Ct St3 Media**	**Ct St4 Media**	**Ct St5 Media**	**Ct St6 Media**
03/01/2025	35,21	31,06	27,32	23,99	20,70	17,53
16/01/2025	35,09	31,12	27,88	24,88	21,17	18,09
27/01/2025	33,65	30,56	27,49	23,78	20,49	17,38
07/02/2025	35,28	32,17	28,62	25,29	21,89	18,47
17/02/2025	35,14	31,50	28,08	25,22	21,93	18,38
11/03/2025	34,85	31,87	28,59	25,27	21,57	18,38
13/03/2025	35,28	31,71	28,43	25,01	21,67	18,29
21/03/2025	35,24	32,01	28,37	25,05	21,60	18,47
08/04/2025	34,71	32,04	28,14	25,06	21,72	18,45
24/04/2025	35,34	32,02	28,30	25,04	21,63	18,41
02/05/2025	34,99	31,93	28,80	24,86	21,58	18,45
07/05/2025	34,93	31,75	28,53	25,13	21,54	18,47
15/05/2025	35,10	31,75	28,28	25,03	21,70	18,34
29/05/2025	35,25	32,03	28,34	24,77	21,49	18,28
17/06/2025	35,56	32,00	28,46	25,02	21,49	18,42
20/06/2025	34,60	31,95	28,14	24,91	21,57	18,17
27/06/2025	34,84	30,42	27,32	24,13	20,84	17,41
04/07/2025	35,81	31,95	28,43	24,87	21,62	18,66
Media	**35,05**	**31,66**	**28,19**	**24,85**	**21,45**	**18,22**
DS	**0,46**	**0,52**	**0,43**	**0,43**	**0,40**	**0,38**
CV%	**1,26**	**1,61**	**1,50**	**1,70**	**1,80**	**2,05**

Tabella 20: valori medi di Ct ottenuti per le sei diluizioni standard del trascritto p210 *BCR-ABL1*. In fondo alla tabella sono indicati i valori medi complessivi, la deviazione standard (DS) in valore assoluto e il coefficiente di variazione percentuale (CV) calcolati per ciascun punto standard.

Le analisi relative al trascritto p210 *BCR-ABL1* mostrano valori medi di Ct progressivamente decrescenti in funzione della diluizione, con deviazioni standard contenute (≤ 0,52) e coefficienti di variazione sempre inferiori al 2,1%. Questo evidenzia una buona riproducibilità delle misurazioni tra le diverse sedute sperimentali.

ABL1					
Seduta	Ct St2 Media	Ct St3 Media	Ct St4 Media	Ct St5 Media	Ct St6 Media
03/01/2025	31,31	28,37	25,01	21,48	18,39
16/01/2025	28,31	28,31	25,19	21,80	18,54
27/01/2025	32,04	28,01	25,10	20,82	17,86
07/02/2025	32,96	29,34	25,74	22,33	18,83
17/02/2025	32,90	29,14	25,23	22,24	18,59
11/03/2025	32,60	28,99	25,51	21,97	18,85
13/03/2025	32,16	28,72	25,31	22,18	18,84
21/03/2025	33,09	29,43	25,71	22,17	18,87
08/04/2025	32,36	29,11	25,96	22,45	19,16
24/04/2025	32,82	29,31	25,89	22,58	19,16
02/05/2025	32,66	29,39	25,75	22,52	19,15
07/05/2025	32,87	29,37	26,09	22,61	19,25
15/05/2025	33,23	29,06	26,03	22,58	19,16
29/05/2025	32,49	29,12	25,81	22,29	19,14
17/06/2025	32,48	29,20	25,85	22,55	19,33
20/06/2025	32,60	29,05	25,77	22,33	19,11
27/06/2025	31,38	28,15	24,79	21,56	18,14
04/07/2025	32,37	29,42	26,03	22,39	18,99
Media	**32,25**	**28,97**	**25,60**	**22,16**	**18,85**
DS	**1,11**	**0,46**	**0,40**	**0,48**	**0,41**
CV%	**3,45**	**1,59**	**1,55**	**2,15**	**2,15**

Tabella 21: Per ciascuna seduta sperimentale sono riportati i valori medi di Ct ottenuti per le cinque diluizioni standard del gene di controllo ABL1. In fondo alla tabella sono indicati i valori medi complessivi, la deviazione standard (DS) in valore assoluto e il coefficiente di variazione percentuale (CV) calcolati per ciascun punto standard.

Anche per il gene di controllo ABL1 si osserva un andamento coerente dei valori medi di Ct, con una variabilità leggermente più marcata rispetto al target *BCR-ABL1*, ma comunque entro limiti accettabili (CV% ≤ 3,5%).

Nel complesso, entrambi i geni confermano la stabilità delle misurazioni e la robustezza del sistema di amplificazione.

4.2.3 Analisi efficienza

È stata quindi calcolata l'efficienza percentuale di amplificazione per ogni seduta analitica partendo dal valore della *slope* ottenuto (Tabella 22). In questo modo è stato possibile valutare la qualità e l'affidabilità delle reazioni di PCR eseguite.

È stata applicata la seguente formula per il calcolo dell'efficienza:

$$E = \left(10^{(-1/slope)} - 1\right)x100$$

	p210 BCR-ABL1	
Seduta	Slope	Efficienza %
03/01/2025	-3,51	92,71
16/01/2025	-3,38	97,63
27/01/2025	-3,29	101,35
07/02/2025	-3,38	97,63
17/02/2025	-3,30	101,14
11/03/2025	-3,33	99,66
13/03/2025	-3,38	97,63
21/03/2025	-3,38	97,63
08/04/2025	-3,29	101,35
24/04/2025	-3,40	96,84
02/05/2025	-3,36	98,44
07/05/2025	-3,32	100,08
15/05/2025	-3,35	98,84
29/05/2025	-3,43	95,68
17/06/2025	-3,45	94,92
20/06/2025	-3,33	99,66
27/06/2025	-3,40	96,84
04/07/2025	-3,44	95,30
Media	**-3,37**	**97,96**
DS	**0,06**	**2,38**
CV%	**1,78**	**2,43**

	ABL1	
Seduta	Slope	Efficienza %
03/01/2025	-3,27	102,21
16/01/2025	-3,25	103,09
27/01/2025	-3,55	91,29
07/02/2025	-3,53	91,99
17/02/2025	-3,55	91,29
11/03/2025	-3,45	94,92
13/03/2025	-3,32	100,08
21/03/2025	-3,57	90,60
08/04/2025	-3,31	100,50
24/04/2025	-3,40	96,84
02/05/2025	-3,39	97,24
07/05/2025	-3,40	96,84
15/05/2025	-3,46	94,54
29/05/2025	-3,35	98,84
17/06/2025	-3,30	101,09
20/06/2025	-3,37	98,03
27/06/2025	-3,30	100,92
04/07/2025	-3,24	103,54
Media	**-3,39**	**97,44**
DS	**0,11**	**4,23**
CV%	**3,19**	**4,34**

Tabella 22: Per ciascuna seduta sperimentale sono riportati i valori di slope e della relativa efficienza (%), calcolata utilizzando la formula riportata in precedenza, del trascritto p210 *BCR-ABL1* e al gene di controllo ABL1. In fondo alla tabella sono indicati i valori medi complessivi, la deviazione standard (DS) in valore assoluto e il coefficiente di variazione percentuale (CV).

L'efficienza di reazione è stata rilevata tra 92,71% e 101,35% nelle curve di calibrazione del trascritto p210 *BCR-ABL1*, con una media del 97,96%, una deviazione standard (DS) di 2,38 e un coefficiente di variazione (CV%) del 2,43%.
Nelle curve di amplificazione del gene di controllo ABL1 l'efficienza è risultata compresa tra 90,60% e 103,54%, con una media del 97,44%, una DS di 4,23 e un CV del 4,34%.
In media i valori di efficienza ottenuti rientrano nel range di accettabilità.

4.2.4 Analisi variabilità operatore e lotto dipendente

L'obiettivo dell'analisi statistica che segue è stata quella di valutare la stabilità e la riproducibilità del metodo utilizzato, studiando la variabilità associata alle due principali fonti di potenziale errore, quella **operatore-dipendente** e quella **lotto-dipendente.**

Sono stati confrontati i risultati ottenuti da diversi operatori nell'esecuzione della medesima procedura, al fine di verificare l'eventuale variabilità legata all'operatore che svolge l'analisi. Sono stati analizzati parametri chiave delle curve standard quali *slope*, efficienza, intercetta, R^2 e valori medi di Ct per ogni standard (Tabella 23).

Al contempo è stata condotta un'analisi comparativa tra i diversi lotti di reagenti degli standard utilizzati così da poter identificare eventuali differenze sistematiche legate ai reagenti stessi.

In entrambi i casi, l'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il *Test t di Welch* a due code per il confronto tra gruppi indipendenti, considerando significative le differenze associate a un p-value < 0,05.

I risultati sono stati tabulati e per ognuno di essi sono stati calcolati media, DS e CV%.
E' stato poi applicato il test statistico precedentemente descritto per confrontare i valori ottenuti. Per ciascun parametro considerato (slope, intercetta, R^2 e valori medi di Ct relativi agli standard St1-St6) sono stati riportati in tabella il valore del t di Student, i gradi di libertà, il p-value a due code, l'intervallo di confidenza al 95% e l'indicazione di eventuale significatività statistica.

Ogni seduta è stata associata all'operatore (Op1 e Op2) che l'ha eseguita.

	p210 BCR-ABL1									
	Slope	Efficienza %	Intercetta	R2	Ct St1 Media	Ct St2 Media	Ct St3 Media	Ct St4 Media	Ct St5 Media	Ct St6 Media
Op1	-3,51	92,71	38,25	0,994	35,21	31,06	27,32	23,99	20,70	17,53
	-3,29	101,35	37,08	0,997	33,65	30,56	27,49	23,78	20,49	17,38
	-3,38	97,63	38,63	0,999	35,24	32,01	28,37	25,05	21,60	18,47
	-3,36	98,44	38,54	0,998	34,99	31,93	28,80	24,86	21,58	18,45
	-3,43	95,68	38,70	0,995	35,25	32,03	28,34	24,77	21,49	18,28
	-3,33	99,66	38,21	0,998	34,60	31,95	28,14	24,91	21,57	18,17
Media	**-3,38**	**97,58**	**38,23**	**0,997**	**34,82**	**31,59**	**28,08**	**24,56**	**21,24**	**18,05**
DS	**0,08**	**3,05**	**0,60**	**0,002**	**0,63**	**0,63**	**0,57**	**0,53**	**0,50**	**0,48**
CV%	**2,30**	**3,13**	**1,57**	**0,195**	**1,80**	**1,98**	**2,02**	**2,18**	**2,37**	**2,64**
Op2	-3,38	97,63	38,12	0,996	35,09	31,12	27,88	24,88	21,17	18,09
	-3,38	97,63	38,77	0,999	35,28	32,17	28,62	25,29	21,89	18,47
	-3,30	101,14	38,24	0,995	35,14	31,50	28,08	25,22	21,93	18,38
	-3,33	99,66	38,41	0,996	34,85	31,87	28,59	25,27	21,57	18,38
	-3,38	97,63	38,58	0,999	35,28	31,71	28,43	25,01	21,67	18,29
	-3,29	101,35	38,22	0,998	34,71	32,04	28,14	25,06	21,72	18,45
	-3,40	96,84	38,70	0,999	35,34	32,02	28,30	25,04	21,63	18,41
	-3,32	100,08	38,36	0,999	34,93	31,75	28,53	25,13	21,54	18,47
	-3,35	98,84	38,41	0,999	35,10	31,75	28,28	25,03	21,70	18,34
	-3,45	94,92	38,89	0,998	35,56	32,00	28,46	25,02	21,49	18,42
	-3,40	96,84	37,74	0,993	34,84	30,42	27,32	24,13	20,84	17,41
	-3,44	95,30	38,92	0,997	35,81	31,95	28,43	24,87	21,62	18,66
Media	**-3,37**	**98,16**	**38,45**	**0,997**	**35,16**	**31,69**	**28,25**	**24,99**	**21,56**	**18,31**
DS	**0,05**	**2,10**	**0,35**	**0,002**	**0,32**	**0,49**	**0,37**	**0,30**	**0,30**	**0,31**
CV%	**1,55**	**2,14**	**0,90**	**0,197**	**0,90**	**1,55**	**1,30**	**1,22**	**1,40**	**1,72**

Tabella 23: Per ciascun operatore (Op1 e Op2) sono riportati i parametri delle curve standard del trascritto p210 *BCR-ABL1*, comprensivi di slope, efficienza (%), intercetta, coefficiente di determinazione (R^2) e valori medi di Ct per le sei diluizioni standard. In fondo alla tabella sono indicati i valori medi complessivi, la deviazione standard (DS) in valore assoluto e il coefficiente di variazione percentuale (CV) per ciascun parametro e ciascun punto standard.

Tutti i risultati statistici ottenuti sono stati riassunti nella tabella sottostante (Tabella 24).

	t	df	p-value	IC 95% (ΔOp1 - Op2)	Significativo
Slope	0,44	7	0,67	[-0,0986 ; 0,0678]	No
Efficienza %	0,41	7	0,69	[-3,8538; 2,7005]	No
Intercetta	0,8	6	0,45	[-0,859 ; 0,435]	No
R2	0,51	10	0,62	[-0,0027 ; 0,0017]	No
Ct St1	1,23	6	0,26	[-1,002 ; 0,330]	No
Ct St2	0,34	8	0,74	[-0,774 ; 0,575]	No
Ct St3	0,7	7	0,51	[-0,779 ; 0,423]	No
Ct St4	1,85	6	0,11	[-1.011 ; 0.140]	No
Ct St5	1,45	6	0,20	[-0.870 ; 0.222]	No
Ct St6	1,25	7	0,25	[-0.776 ; 0.239]	No

Tabella 24: Risultati del confronto tra Op1 e Op2 per slope, efficienza, intercetta, R^2 e i valori Ct dei sei livelli. Sono riportati i valori del test t, i gradi di libertà (df), i p-value, e gli intervalli di confidenza al 95% per ciascun parametro analizzato.

L'analisi statistica comparativa tra i due operatori (Op1 e Op2) non ha evidenziato differenze significative per nessuno dei parametri considerati, come confermato dai valori di p-value sempre maggiori di 0,05 e dagli intervalli di confidenza al 95% che comprendono lo zero.
Questi risultati indicano che le misurazioni effettuate dai due operatori sono sostanzialmente sovrapponibili.

Le stesse analisi sono state eseguite per il gene di controllo ABL1 (Tabella 25).

	ABL1								
	Slope	**Efficienza %**	**Intercetta**	**R2**	**Ct St1 Media**	**Ct St2 Media**	**Ct St3 Media**	**Ct St4 Media**	**Ct St6 Media**
Op1	-3,27	102,21	37,99	0,999	31,31	28,37	25,01	21,48	18,39
	-3,55	91,29	38,98	0,994	32,04	28,01	25,10	20,82	17,86
	-3,57	90,60	40,13	0,999	33,09	29,43	25,71	22,17	18,87
	-3,39	97,24	39,46	0,999	32,66	29,39	25,75	22,52	19,15
	-3,35	98,84	39,18	0,999	32,49	29,12	25,81	22,29	19,14
	-3,37	98,03	39,25	0,999	32,60	29,05	25,77	22,33	19,11
Media	**-3,42**	**96,37**	**39,17**	**0,998**	**32,36**	**28,89**	**25,52**	**21,93**	**18,75**
DS	**0,12**	**4,54**	**0,70**	**0,002**	**0,62**	**0,58**	**0,37**	**0,65**	**0,52**
CV%	**0,03**	**0,05**	**0,02**	**0,002**	**0,02**	**0,02**	**0,01**	**0,03**	**0,03**
Op2	-3,25	103,09	38,05	0,999	28,31	28,31	25,19	21,80	18,54
	-3,53	91,99	39,94	0,998	32,96	29,34	25,74	22,33	18,83
	-3,55	91,29	39,83	0,995	32,90	29,14	25,23	22,24	18,59
	-3,45	94,92	39,39	0,999	32,60	28,99	25,51	21,97	18,85
	-3,32	100,08	38,71	0,999	32,16	28,72	25,31	22,18	18,84
	-3,31	100,50	39,04	0,999	32,36	29,11	25,96	22,45	19,16
	-3,40	96,84	39,57	0,999	32,82	29,31	25,89	22,58	19,16
	-3,40	96,84	39,64	0,999	32,87	29,37	26,09	22,61	19,25
	-3,46	94,54	39,86	0,996	33,23	29,06	26,03	22,58	19,16
	-3,30	101,09	39,06	0,998	32,48	29,20	25,85	22,55	19,33
	-3,30	100,92	38,02	0,999	31,38	28,15	24,79	21,56	18,14
	-3,24	103,54	38,84	0,999	32,37	29,42	26,03	22,39	18,99
Media	**-3,38**	**97,97**	**39,16**	**0,998**	**32,20**	**29,01**	**25,63**	**22,27**	**18,90**
DS	**0,11**	**4,16**	**0,66**	**0,001**	**1,32**	**0,41**	**0,42**	**0,34**	**0,35**
CV%	**0,03**	**0,04**	**0,02**	**0,001**	**0,04**	**0,01**	**0,02**	**0,02**	**0,02**

Tabella 25: Per ciascun operatore (Op1 e Op2) sono riportati i parametri delle curve standard del gene di controllo ABL1, comprensivi di slope, efficienza (%), intercetta, coefficiente di determinazione (R^2) e valori medi di Ct per le sei diluizioni standard. Sono indicati i valori medi complessivi, la deviazione standard (DS) in valore assoluto e il coefficiente di variazione percentuale (CV) per ciascun parametro e ciascun punto standard.

Tutti i risultati statistici ottenuti sono stati riassunti nella tabella sottostante (Tabella 26).

	t	df	p-value	IC 95% (ΔOp1 - Op2)	Significativo
Slope	0,75	9,00	0,47	[-0,17155 ; 0,08622]	No
Efficienza %	0.72	9,00	0.47	[-6,5942; 3,3908]	No
Intercetta	0,01	9,00	0,99	[-0,7751 ; 0,7801]	No
R2	0,09	7,00	0,93	[-0,00226 ; 0,00209]	No
Ct St2	0,35	15,00	0,73	[-0,8112 ; 1,13362]	No
Ct St3	0,43	7,00	0,68	[-0,7377 ; 0,510]	No
Ct St4	0,56	11,00	0,58	[-0,534 ; 0,3155]	No
Ct St5	1,18	6,00	0,28	[-1,031 ; 0.361]	No
Ct St6	0,64	7,00	0,55	[-0,709 ; 0,409]	No

Tabella 26: Risultati del confronto tra Op1 e Op2 per slope, efficienza%, intercetta, R^2 e valori Ct dei sei livelli. Sono riportati i valori del test t, i gradi di libertà (df), i p-value, e gli intervalli di confidenza al 95% per ciascun parametro analizzato.

L'analisi statistica comparativa tra i due operatori non ha evidenziato differenze significative per nessuno dei parametri considerati. Ciò viene confermato dai valori di p-value tutti superiori a 0,05 e dagli intervalli di confidenza al 95% che comprendono lo zero. Questi risultati indicano che le misurazioni effettuate dai due operatori sono coerenti tra loro, confermando la riproducibilità, la correttezza dell'amplificazione e l'affidabilità complessiva del metodo sperimentale.

Le stesse considerazioni sono state applicate per valutare la potenziale variabilità associata ai diversi lotti di reagenti utilizzati durante le diverse sedute (Tabella 27 per p210 e Tabella 28 per ABL1), al fine di completare l'analisi di riproducibilità e robustezza del metodo.
Considerato il numero limitato di osservazioni, per alcuni lotti non è stato possibile applicare un test ANOVA con sufficiente potere statistico. L'ANOVA, infatti, è il test più indicato per confrontare le medie di più gruppi e valutare l'eventuale presenza di differenze significative.
Tuttavia, la ridotta numerosità dei campioni ha reso preferibile un'analisi descrittiva delle medie e delle misure di variabilità per ciascun lotto.

	p210 BCR-ABL1									
	Slope	Efficienza %	Intercetta	R2	Ct St1 Media	Ct St2 Media	Ct St3 Media	Ct St4 Media	Ct St5 Media	Ct St6 Media
Lotto 02202-240612	-3,51	92,71	38,25	0,994	35,21	31,06	27,32	23,99	20,70	17,53
	-3,38	97,63	38,12	0,996	35,09	31,12	27,88	24,88	21,17	18,09
Media	**-3,45**	**95,17**	**38,19**	**0,995**	**35,15**	**31,09**	**27,60**	**24,43**	**20,93**	**17,81**
DS	**0,09**	**3,48**	**0,09**	**0,001**	**0,09**	**0,04**	**0,39**	**0,63**	**0,33**	**0,40**
CV%	**2,67**	**3,66**	**0,24**	**0,142**	**0,25**	**0,14**	**1,42**	**2,59**	**1,57**	**2,24**
Lotto 02914-240801	-3,29	101,35	37,08	0,997	33,65	30,56	27,49	23,78	20,49	17,38
	-3,38	97,63	38,77	0,999	35,28	32,17	28,62	25,29	21,89	18,47
	-3,30	101,14	38,24	0,995	35,14	31,50	28,08	25,22	21,93	18,38
	-3,33	99,66	38,41	0,996	34,85	31,87	28,59	25,27	21,57	18,38
	-3,38	97,63	38,58	0,999	35,28	31,71	28,43	25,01	21,67	18,29
	-3,38	97,63	38,63	0,999	35,24	32,01	28,37	25,05	21,60	18,47
	-3,29	101,35	38,22	0,998	34,71	32,04	28,14	25,06	21,72	18,45
	-3,40	96,84	38,70	0,999	35,34	32,02	28,30	25,04	21,63	18,41
	-3,36	98,44	38,54	0,998	34,99	31,93	28,80	24,86	21,58	18,45
	-3,32	100,08	38,36	0,999	34,93	31,75	28,53	25,13	21,54	18,47
	-3,35	98,84	38,41	0,999	35,10	31,75	28,28	25,03	21,70	18,34
	-3,43	95,68	38,70	0,995	35,25	32,03	28,34	24,77	21,49	18,28
	-3,45	94,92	38,89	0,998	35,56	32,00	28,46	25,02	21,49	18,42
	-3,33	99,66	38,21	0,998	34,60	31,95	28,14	24,91	21,57	18,17
Media	**-3,36**	**98,63**	**38,41**	**0,998**	**34,99**	**31,81**	**28,32**	**24,96**	**21,56**	**18,31**
DS	**0,05**	**2,04**	**0,44**	**0,001**	**0,47**	**0,40**	**0,31**	**0,37**	**0,34**	**0,28**
CV%	**1,50**	**2,07**	**1,14**	**0,148**	**1,34**	**1,25**	**1,11**	**1,48**	**1,56**	**1,55**
Lotto 00140-250117	-3,40	96,84	37,74	0,993	34,84	30,42	27,32	24,13	20,84	17,41
	-3,44	95,30	38,92	0,997	35,81	31,95	28,43	24,87	21,62	18,66
Media	**-3,42**	**96,07**	**38,33**	**0,995**	**35,32**	**31,18**	**27,88**	**24,50**	**21,23**	**18,03**
DS	**0,03**	**1,09**	**0,83**	**0,003**	**0,68**	**1,08**	**0,78**	**0,52**	**0,55**	**0,88**
CV%	**0,83**	**1,14**	**2,18**	**0,284**	**1,93**	**3,47**	**2,82**	**2,14**	**2,60**	**4,90**

Tabella 27: Analisi media, DS e CV% suddividendo le sedute di analisi sulla base al numero di lotto degli standard che è stato utilizzato (trascritto p210).

	ABL1								
	Slope	Efficienza %	Intercetta	R2	Ct St1 Media	Ct St2 Media	Ct St3 Media	Ct St4 Media	Ct St6 Media
Lotto 02202-240612	-3,27	102,21	37,99	0,999	31,31	28,37	25,01	21,48	18,39
	-3,25	103,09	38,05	0,999	28,31	28,31	25,19	21,80	18,54
Media	**-3,26**	**102,65**	**38,02**	**0,999**	**29,81**	**28,34**	**25,10**	**21,64**	**18,47**
DS	**0,01**	**0,62**	**0,04**	**0,000**	**2,12**	**0,05**	**0,13**	**0,23**	**0,11**
CV%	**0,43**	**0,60**	**0,11**	**0,000**	**7,12**	**0,16**	**0,51**	**1,06**	**0,57**
Lotto 02914-240801	-3,55	91,29	38,98	0,994	32,04	28,01	25,10	20,82	17,86
	-3,53	91,99	39,94	0,998	32,96	29,34	25,74	22,33	18,83
	-3,55	91,29	39,83	0,995	32,90	29,14	25,23	22,24	18,59
	-3,45	94,92	39,39	0,999	32,60	28,99	25,51	21,97	18,85
	-3,32	100,08	38,71	0,999	32,16	28,72	25,31	22,18	18,84
	-3,57	90,60	40,13	0,999	33,09	29,43	25,71	22,17	18,87
	-3,31	100,50	39,04	0,999	32,36	29,11	25,96	22,45	19,16
	-3,40	96,84	39,57	0,999	32,82	29,31	25,89	22,58	19,16
	-3,39	97,24	39,46	0,999	32,66	29,39	25,75	22,52	19,15
	-3,40	96,84	39,64	0,999	32,87	29,37	26,09	22,61	19,25
	-3,46	94,54	39,86	0,996	33,23	29,06	26,03	22,58	19,16
	-3,35	98,84	39,18	0,999	32,49	29,12	25,81	22,29	19,14
	-3,30	101,09	39,06	0,998	32,48	29,20	25,85	22,55	19,33
	-3,37	98,03	39,25	0,999	32,60	29,05	25,77	22,33	19,11
Media	**-3,42**	**96,01**	**39,43**	**0,998**	**32,66**	**29,09**	**25,69**	**22,26**	**18,95**
DS	**0,09**	**3,63**	**0,42**	**0,002**	**0,34**	**0,36**	**0,30**	**0,46**	**0,38**
CV%	**0,03**	**0,04**	**0,01**	**0,002**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,02**	**0,02**
Lotto 00140-250117	-3,30	100,92	38,02	0,999	31,38	28,15	24,79	21,56	18,14
	-3,24	103,54	38,84	0,999	32,37	29,42	26,03	22,39	18,99
Media	**-3,27**	**102,23**	**38,43**	**0,999**	**31,87**	**28,79**	**25,41**	**21,97**	**18,56**
DS	**0,04**	**1,85**	**0,58**	**0,000**	**0,70**	**0,90**	**0,87**	**0,58**	**0,60**
CV%	**0,01**	**0,02**	**0,02**	**0,000**	**0,02**	**0,03**	**0,03**	**0,03**	**0,03**

Tabella 28: Analisi media, DS e CV% suddividendo le sedute di analisi sulla base al numero di lotto degli standard che è stato utilizzato (gene housekeeping ABL1).

Le analisi dei diversi lotti di p210 *BCR-ABL1* e del gene di controllo ABL1 mostrano una buona riproducibilità dei parametri misurati.
Il primo lotto (02202-240612) presenta un numero limitato di sedute perché rappresenta la conclusione del lotto dell'anno precedente, mentre l'ultimo lotto (00140-250117) include poche sedute in quanto le analisi sono state iniziate recentemente e le misurazioni condotte per la stesura di questo elaborato si sono interrotte in questa fase.

Per la disparità nel numero di sedute tra i lotti, l'analisi comparativa è stata condotta principalmente sul lotto centrale (02914-240801), che rappresenta il lotto principale con il maggior numero di sedute. In questo lotto, i valori medi di slope e di efficienza per p210 *BCR-ABL1* si attestano rispettivamente a -3,36 e 98,63%, mentre per ABL1 sono pari a -3,42 e 96,01%. Le deviazioni standard e i coefficienti di variazione risultano contenuti per tutti i parametri, confermando la stabilità delle misurazioni.
I valori di intercetta, R^2 e Ct medi per le diverse diluizioni mostrano una variazione limitata tra le sedute, a conferma della robustezza del metodo di amplificazione adottato e della coerenza dei dati raccolti tra i diversi lotti.

4.3 *JAK2*

Viene riportata di seguito l'analisi delle sedute relative al target V617F del gene *JAK2*, effettuate nel medesimo intervallo temporale preso in considerazione per il trascritto p210 *BCR-ABL1*; le sedute di analisi eseguite sono 16.
L'analisi che segue è stata condotta in maniera analoga a quanto precedentemente descritto per *BCR-ABL1*.

4.3.1 Valutazione della ripetibilità degli standard

Per la mutazione *JAK2* e il rispettivo controllo wild type, la ripetibilità intra-seduta è stata valutata seguendo l'approccio precedentemente descritto: gli standard sono stati analizzati in doppio nella stessa seduta e, dai valori di Ct ottenuti, sono stati ricavati media, deviazione standard (DS) e coefficiente di variazione (CV%) per ogni livello di standard (Tabella 29 e Tabella 30).

V617F								
Seduta	DS St1	CV% St1	DS St2	CV% St2	DS St3	CV% St3	DS St4	CV% St4
21/01/2025	0,42	1,16	0,39	1,16	0,10	0,33	0,17	0,64
03/02/2025	0,36	1,00	0,00	0,00	0,09	0,32	0,23	0,89
12/02/2025	0,59	1,61	0,06	0,19	0,06	0,22	0,01	0,03
24/02/2025	0,30	0,82	0,06	0,19	0,32	1,07	0,11	0,40
06/03/2025	0,30	0,80	0,07	0,21	0,17	0,57	0,30	1,12
19/03/2025	0,16	0,44	0,43	1,29	0,08	0,26	0,06	0,24
27/03/2025	0,00	0,01	0,16	0,47	0,01	0,05	0,02	0,08
07/04/2025	0,01	0,02	0,05	0,15	0,21	0,71	0,18	0,70
14/04/2025	0,20	0,53	0,12	0,36	0,02	0,07	0,33	1,24
05/05/2025	1,36	3,64	0,18	0,53	0,21	0,71	0,08	0,32
14/05/2025	0,27	0,71	0,01	0,02	0,08	0,28	0,21	0,78
27/05/2025	0,65	1,73	0,10	0,29	0,10	0,33	0,15	0,56
10/06/2025	0,21	0,57	0,13	0,37	0,01	0,05	0,18	0,68
13/06/2025	0,23	0,61	0,27	0,79	0,01	0,05	0,26	0,96
25/06/2025	0,37	1,03	0,06	0,19	0,02	0,07	0,52	1,97
01/07/2025	0,39	1,07	0,16	0,49	0,04	0,14	0,04	0,16

Tabella 29: Nella tabella sono riportati, per ciascuna seduta analitica, i valori di deviazione standard (DS) in valore assoluto e coefficiente di variazione (CV%) calcolati sui quattro standard di quantificazione utilizzati per il gene *JAK2* V617F.

Gli standard (St1–St4) corrispondono rispettivamente a concentrazioni crescenti della mutazione: Standard 1 (St1: $5x10^1$ copie di mutazione); St2: Standard 2 (St2: $5x10^2$ copie di mutazione); St3: Standard 3 (St3: $5x10^3$ copie di mutazione); St 4: Standard 4 (St4: $5x10^4$ copie di mutazione).

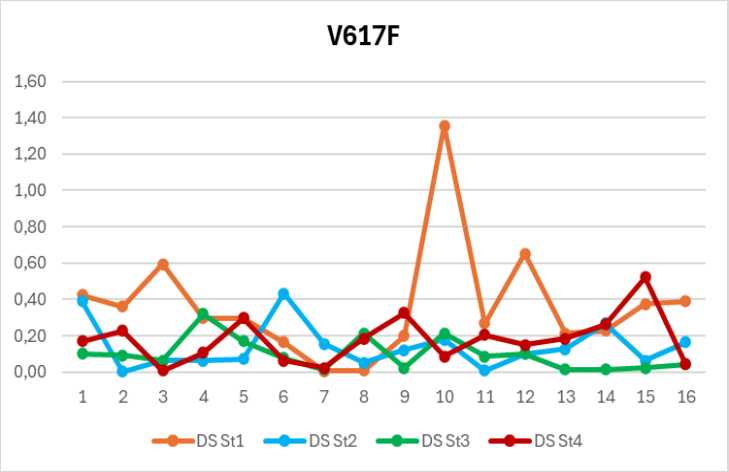

Grafico 3: andamento della deviazione standard (DS) degli standard di calibrazione per *JAK2* V617F. Sono riportati i valori minimi e massimi registrati per ciascuno dei quattro standard (St1–St4) nelle diverse sedute sperimentali.

L'analisi dell'andamento delle deviazioni standard (Grafico 3) evidenzia una buona riproducibilità delle misurazioni per tutti e quattro gli standard della curva *JAK2* V617F. I valori di DS si mantengono generalmente contenuti (in prevalenza inferiori a 0,6), con sporadici incrementi puntuali, come osservato nello standard 1 (DS = 1,36 il 05/05/2025).

Anche i coefficienti di variazione (CV%) risultano costantemente inferiori al 5%, indice di una variabilità intra-seduta limitata e accettabile.

WT								
Seduta	DS St1	CV% St1	DS St2	CV% St2	DS St3	CV% St3	DS St4	CV% St4
21/01/2025	0,18	0,52	0,08	0,27	0,16	0,58	0,11	0,46
03/02/2025	0,32	0,91	0,12	0,39	0,12	0,43	0,06	0,26
12/02/2025	0,82	2,33	0,15	0,46	0,17	0,60	0,01	0,06
24/02/2025	0,59	1,70	0,08	0,27	0,24	0,86	0,09	0,37
06/03/2025	0,69	1,94	0,06	0,18	0,06	0,22	0,15	0,59
19/03/2025	0,02	0,06	0,07	0,22	0,01	0,05	0,11	0,43
27/03/2025	0,59	1,65	0,16	0,48	0,10	0,34	0,04	0,17
07/04/2025	0,44	1,22	0,25	0,79	0,47	1,63	0,05	0,20
14/04/2025	0,01	0,04	0,01	0,02	0,07	0,25	0,05	0,20
05/05/2025	0,17	0,48	0,21	0,67	0,07	0,25	0,12	0,48
14/05/2025	0,24	0,68	0,13	0,40	0,01	0,05	0,02	0,09
27/05/2025	0,35	1,01	0,11	0,33	0,05	0,17	0,04	0,14
10/06/2025	0,40	1,11	0,07	0,22	0,01	0,05	0,14	0,56
13/06/2025	0,21	0,58	0,33	1,03	0,06	0,22	0,02	0,08
25/06/2025	0,00	0,01	0,32	1,00	0,10	0,36	0,08	0,32
01/07/2025	0,01	0,04	0,23	0,73	0,05	0,18	0,05	0,20

Tabella 30: Nella tabella sono riportati, per ciascuna seduta analitica, i valori di deviazione standard (DS) in valore assoluto e coefficiente di variazione (CV%) calcolati sui quattro standard di quantificazione utilizzati per il gene *JAK2* wild-type.

Gli standard (St1–St4) corrispondono rispettivamente a concentrazioni crescenti del gene wild type: Standard 1 (St1: $5x10^1$ copie di mutazione); St2: Standard 2 (St2: $5x10^2$ copie di mutazione); St3: Standard 3 (St3: $5x10^3$ copie di mutazione); St 4: Standard 4 (St4: $5x10^4$ copie di mutazione).

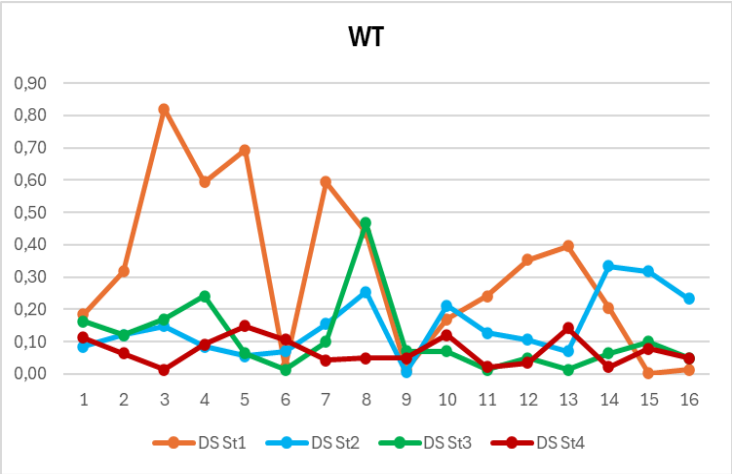

Grafico 4: andamento della deviazione standard (DS) degli standard di calibrazione per *JAK2* WT nel periodo gennaio–luglio 2025. Sono riportati i valori minimi e massimi registrati per ciascuno dei quattro standard (St1–St4).

Le deviazioni standard relative alla curva di calibrazione del *JAK2* WT si mantengono generalmente basse e stabili durante tutto il periodo analizzato (Grafico 4). I valori di DS risultano nella maggior parte dei casi inferiori a 0,5, con un'unica eccezione nello standard 1 (DS = 0,82 il 12/02/2025), che rappresenta l'unico picco degno di nota. Analogamente, i coefficienti di variazione (CV%) restano

costantemente al di sotto del 5%, confermando una buona ripetibilità intra-seduta e l'assenza di variazioni significative tra i diversi momenti di analisi.

4.3.2 Valutazione della riproducibilità degli standard

La riproducibilità è stata verificata confrontando i valori di Ct degli standard ottenuti in sedute sperimentali differenti e analizzando i parametri globali delle curve di calibrazione (slope, intercetta e R^2). In questo modo è stato possibile valutare la stabilità del metodo nel tempo e stimarne l'imprecisione complessiva (Tabella 31 e Tabella 32).

V617F							
Seduta	Slope	Intercetta	R2	Ct St1 Media	Ct St2 Media	Ct St3 Media	Ct St4 Media
21/01/2025	-3,45	42,56	0,995	36,55	32,52	29,67	26,33
03/02/2025	-3,46	41,87	0,998	35,93	32,55	29,14	25,53
12/02/2025	-3,49	42,68	0,995	36,84	33,21	29,55	26,41
24/02/2025	-3,28	41,79	0,996	36,10	33,08	29,80	26,28
06/03/2025	-3,54	43,11	0,997	37,22	33,43	29,86	26,60
19/03/2025	-3,55	42,99	0,998	36,97	33,37	29,88	26,30
27/03/2025	-3,59	43,31	0,998	37,44	33,45	30,03	26,50
07/04/2025	-3,51	42,77	0,997	36,60	33,52	29,71	26,29
14/04/2025	-3,79	43,69	0,995	37,45	33,33	29,37	26,15
05/05/2025	-3,66	43,49	0,985	37,27	33,63	29,91	26,31
14/05/2025	-3,79	43,93	0,997	37,66	33,48	29,84	26,24
27/05/2025	-3,65	43,72	0,995	37,53	33,93	30,00	26,66
10/06/2025	-3,43	42,96	0,997	36,99	34,00	30,18	26,84
13/06/2025	-3,23	42,45	0,997	36,87	33,91	30,36	27,28
25/06/2025	-3,29	42,02	0,994	36,26	33,43	29,81	26,51
01/07/2025	-3,40	42,43	0,996	36,49	33,45	30,01	26,32
Media	**-3,51**	**42,86**	**0,996**	**36,89**	**33,39**	**29,82**	**26,41**
DS	**0,01**	**0,04**	**0,000**	**0,03**	**0,02**	**0,02**	**0,02**
CV%	**0,29**	**0,10**	**0,019**	**0,09**	**0,07**	**0,06**	**0,09**

Tabella 31: Parametri di calibrazione e valori medi dei Ct degli standard (St1–St4) per *JAK2* V617F nelle diverse sedute di analisi analitiche. Sono riportati i valori di slope, intercetta, R^2, media, deviazione standard (DS) in valore assoluto e coefficiente di variazione percentuale (CV%).

L'analisi dei parametri di calibrazione mostra un'elevata stabilità nel tempo. La slope ha mantenuto valori molto vicini alla media (-3,51), con una variabilità minima (DS = 0,01; CV% = 0,29%), confermando la costanza delle condizioni di amplificazione. L'intercetta si è mantenuta stabile e l'R^2 è rimasto prossimo a 1.

Per quanto riguarda i valori medi di Ct, si osserva una progressione regolare dagli standard a più alta concentrazione (St4: media 26,41) fino allo standard più diluito (St1: media 36,89), con una variabilità molto contenuta in tutti i punti (CV% $\leq$ 0,09%).

WT							
Seduta	Slope	Intercetta	R2	Ct St1 Media	Ct St2 Media	Ct St3 Media	Ct St4 Media
21/01/2025	-3,55	41,33	0,999	35,36	31,66	28,19	24,68
03/02/2025	-3,53	40,83	0,998	34,92	31,20	27,71	24,33
12/02/2025	-3,36	40,94	0,992	35,16	32,08	28,32	25,22
24/02/2025	-3,34	40,57	0,995	34,84	31,70	28,08	24,91
06/03/2025	-3,57	41,76	0,995	35,79	32,04	28,45	25,09
19/03/2025	-3,56	41,74	0,999	35,58	32,27	28,59	24,93
27/03/2025	-3,49	41,89	0,996	35,92	32,49	29,13	25,42
07/04/2025	-3,67	42,23	0,996	35,98	32,37	28,55	25,02
14/04/2025	-3,7	42,09	0,999	35,81	32,14	28,35	24,75
05/05/2025	-3,52	41,48	0,997	33,67	31,81	28,38	25,09
14/05/2025	-3,48	41,26	0,999	35,30	31,92	28,37	24,88
27/05/2025	-3,34	40,83	0,997	35,04	32,02	28,40	25,11
10/06/2025	-3,46	41,69	0,998	35,79	32,37	28,92	25,40
13/06/2025	-3,34	41,15	0,996	35,26	32,43	28,79	25,34
25/06/2025	-3,43	40,81	0,996	34,71	31,80	28,07	24,67
01/07/2025	-3,54	41,44	0,999	35,41	31,95	28,24	24,85
Media	**-3,49**	**41,38**	**0,997**	**35,28**	**32,02**	**28,41**	**24,98**
DS	**0,11**	**0,48**	**0,002**	**0,57**	**0,33**	**0,33**	**0,28**
CV%	**3,08**	**1,17**	**0,193**	**1,60**	**1,03**	**1,17**	**1,14**

Tabella 32: Parametri di calibrazione per *JAK2* WT nelle diverse sedute di analisi (gennaio–luglio 2025). Sono riportati i valori di slope, intercetta e coefficiente di determinazione (R^2), insieme ai valori medi di Ct dei quattro standard di calibrazione (St1–St4), con relative medie, deviazione standard (DS) in valore assoluto e coefficienti di variazione (CV%).

I risultati ottenuti per il WT mostrano una buona stabilità complessiva delle curve di calibrazione nel periodo analizzato. La slope ha mantenuto valori vicini alla media (-3,49) con una variabilità contenuta indicando un andamento regolare delle amplificazioni.

L'intercetta si è mantenuta stabile (media = 41,38; CV% = 1,17%), mentre i valori di R^2 sono rimasti costantemente molto prossimi a 1.

Per quanto riguarda i Ct, si osserva una progressione coerente dai campioni a maggiore concentrazione (St4: media 24,98) fino a quelli a concentrazione più bassa (St1: media 35,28), con una variabilità ridotta in tutti gli standard (CV% tra 1,03% e 1,60%).

4.3.3 Analisi efficienza V617F e WT

L'analisi dell'efficienza delle curve di amplificazione per le due mix di reazione è stata calcolata partendo dai valori delle slope e calcolate con la medesima formula applicata per la valutazione del trascritto p210 (Tabella 33).

	JAK2 WT	
Seduta	Slope	Efficienza %
21/01/2025	-3,55	91,26
03/02/2025	-3,53	91,99
12/02/2025	-3,36	98,44
24/02/2025	-3,34	99,25
06/03/2025	-3,57	90,60
19/03/2025	-3,56	90,94
27/03/2025	-3,49	93,43
07/04/2025	-3,67	87,27
14/04/2025	-3,70	86,32
05/05/2025	-3,52	92,35
14/05/2025	-3,48	93,80
27/05/2025	-3,34	99,25
10/06/2025	-3,46	94,54
13/06/2025	-3,34	99,25
25/06/2025	-3,43	95,68
01/07/2025	-3,54	91,64
Media	**-3,49**	**93,50**
DS	**0,11**	**4,06**
CV%	**3,18**	**4,34**

	JAK2 V617F	
Seduta	Slope	Efficienza %
21/01/2025	-3,45	94,90
03/02/2025	-3,46	94,54
12/02/2025	-3,49	93,43
24/02/2025	-3,28	101,78
06/03/2025	-3,54	91,64
19/03/2025	-3,55	91,29
27/03/2025	-3,59	89,91
07/04/2025	-3,51	92,71
14/04/2025	-3,79	83,59
05/05/2025	-3,66	87,60
14/05/2025	-3,79	83,59
27/05/2025	-3,65	87,92
10/06/2025	-3,43	95,68
13/06/2025	-3,23	103,98
25/06/2025	-3,29	101,35
01/07/2025	-3,40	96,84
Media	**-3,51**	**93,17**
DS	**0,17**	**6,01**
CV%	**4,73**	**6,45**

Tabella 33: Tabella dei valori di *slope* ed efficienza (%) ottenuti nelle diverse sedute sperimentali per i target *JAK2* WT e *JAK2* V617F, con i relativi valori medi, deviazione standard (DS) in valore assoluto e coefficiente di variazione (CV%).

Le curve di calibrazione relative a *JAK2* WT hanno mostrato valori di slope compresi tra -3,70 e -3,34, con una media di -3,49 e una deviazione standard di 0,11, corrispondente a un coefficiente di variazione (CV%) del 3,18%.

L'efficienza di reazione è risultata compresa tra 86,32% e 99,25%, con un valore medio pari al 93,50% e una variabilità contenuta (DS = 4,06; CV% = 4,34%).

Per quanto riguarda *JAK2* V617F, i valori di slope hanno oscillato tra -3,79 e -3,23, con una media di -3,51 e una deviazione standard di 0,17 (CV% = 4,73%).

L'efficienza di reazione è risultata compresa tra 83,59% e 103,98%, con una media pari al 93,17% e una maggiore variabilità rispetto al WT (DS = 6,01; CV% = 6,45%).

Nel complesso, entrambi i target hanno mostrato valori di slope prossimi all'ideale (–3,32) ed efficienze medie vicine al 100%, sebbene *JAK2* V617F evidenzi una variabilità leggermente superiore rispetto al WT.

4.3.4 Analisi variabilità operatore e lotto dipendente

Per la mutazione *JAK2*, la stabilità e la riproducibilità del metodo sono state valutate sempre considerando sia la variabilità legata all'operatore sia quella associata ai diversi lotti di reagenti. Sono stati confrontati i parametri principali delle curve standard (slope, efficienza, intercetta, R^2 e valori medi di Ct) e le differenze sono state verificate mediante Test t di Welch a due code ($p < 0,05$).

Sono stati valutati i valori ottenuti sia per l'analisi della mutazione che per il wild-type.

	V617F							
	Slope	Efficienza %	Intercetta	R2	Ct St1 Media	Ct St2 Media	Ct St3 Media	Ct St4 Media
Op1	-3,45	94,92	42,56	0,995	36,55	32,52	29,67	26,33
	-3,46	94,54	41,87	0,998	35,93	32,55	29,14	25,53
	-3,49	93,43	42,68	0,995	36,84	33,21	29,55	26,41
	-3,28	101,78	41,79	0,996	36,10	33,08	29,80	26,28
	-3,54	91,64	43,11	0,997	37,22	33,43	29,86	26,60
	-3,55	91,29	42,99	0,998	36,97	33,37	29,88	26,30
	-3,59	89,91	43,31	0,998	37,44	33,45	30,03	26,50
	-3,43	95,68	42,96	0,997	36,99	34,00	30,18	26,84
	-3,40	96,84	42,43	0,996	36,49	33,45	30,01	26,32
Media	**-3,48**	**93,93**	**42,62**	**0,997**	**36,72**	**33,09**	**29,70**	**26,28**
DS	**0,10**	**3,91**	**0,59**	**0,001**	**0,56**	**0,40**	**0,29**	**0,35**
CV%	**2,92**	**4,16**	**1,39**	**0,138**	**1,53**	**1,21**	**0,99**	**1,33**
Op2	-3,79	83,59	43,69	0,995	37,45	33,33	29,37	26,15
	-3,66	87,60	43,49	0,985	37,27	33,63	29,91	26,31
	-3,79	83,59	43,93	0,997	37,66	33,48	29,84	26,24
	-3,29	101,35	42,02	0,994	36,26	33,43	29,81	26,51
Media	**-3,63**	**89,03**	**43,28**	**0,993**	**37,16**	**33,47**	**29,73**	**26,30**
DS	**0,24**	**8,43**	**0,86**	**0,005**	**0,62**	**0,13**	**0,25**	**0,15**
CV%	**6,51**	**9,46**	**1,99**	**0,535**	**1,67**	**0,37**	**0,82**	**0,58**

Tabella 34: Valori di *slope*, intercetta, R^2 e Ct medi degli standard (St1–St4) nelle curve di calibrazione per il target *JAK2* V617F, eseguite da due operatori (Op1 e Op2). Sono riportati i valori delle singole sedute, le medie, la deviazione standard (DS) in valore assoluto e il coefficiente di variazione (CV%).

Tutti i risultati statistici ottenuti sono stati riassunti nella tabella 35.

	t	df	p-value	IC 95% (ΔOp1 - Op2)	Significativo
Slope	1,37	3	0,27	[-0,2219 ; 0,5558]	No
Efficienza %	1,24	3	0,30	[-8,5113; 19,3419]	No
Intercetta	1,39	4	0,24	[-1,9413 ; 0,6430]	No
R2	1,46	3	0,24	[-0,00464 ; 0,01247]	No
Ct St1	1,23	4	0,29	[-1,4131 ; 0,5442]	No
Ct St2	1,42	10	0,18	[-0,6118 ; 0,1346]	No
Ct St3	0,37	7	0,73	[-0,3203 ; 0,4375]	No
Ct St4	0,37	7	0,73	[-0,3203 ; 0,4375]	No

Tabella 35: Risultati del confronto tra Op1 e Op2 per slope, intercetta, R^2 e valori Ct dei sei stadi. Sono riportati i valori del test t, i gradi di libertà (df), i p-value, e gli intervalli di confidenza al 95% per ciascun parametro analizzato (pendenza, intercetta, R^2 e valori Ct dei sei standard).

Il confronto tra le curve di calibrazione di *JAK2* V617F generate da Op1 e Op2 mostra una buona concordanza complessiva. Op1 ha prodotto valori medi di slope, intercetta ed efficienza % stabili, con R^2 elevato (≥0,997) e variabilità contenuta, mentre Op2 ha riportato parametri sovrapponibili, seppur con una dispersione leggermente più ampia per slope ed efficienza.

L'analisi statistica (Tabella 35) conferma che non vi sono differenze significative tra i due operatori per nessuno dei parametri considerati. Tutti i p-value risultano infatti >0,05 e gli intervalli di

confidenza al 95% comprendono lo zero, indicando che le differenze osservate rientrano nella normale variabilità tecnica.

Le stesse analisi sono state eseguite per l'allele wild type (Tabella 36).

	WT							
	Slope	Efficienza %	Intercetta	R2	Ct St1 Media	Ct St2 Media	Ct St3 Media	Ct St4 Media
Op1	-3,55	91,29	41,33	0,999	35,36	31,66	28,19	24,68
	-3,53	91,99	40,83	0,998	34,92	31,20	27,71	24,33
	-3,36	98,44	40,94	0,992	35,16	32,08	28,32	25,22
	-3,34	99,25	40,57	0,995	34,84	31,70	28,08	24,91
	-3,57	90,60	41,76	0,995	35,79	32,04	28,45	25,09
	-3,56	90,94	41,74	0,999	35,58	32,27	28,59	24,93
	-3,49	93,43	41,89	0,996	35,92	32,49	29,13	25,42
	-3,46	94,54	41,69	0,998	35,79	32,37	28,92	25,40
	-3,54	91,64	41,44	0,999	35,41	31,95	28,24	24,85
Media	**-3,49**	**93,71**	**41,29**	**0,996**	**35,37**	**31,92**	**28,35**	**24,94**
DS	**0,10**	**3,64**	**0,52**	**0,003**	**0,42**	**0,43**	**0,44**	**0,36**
CV%	**2,77**	**3,88**	**1,27**	**0,257**	**1,18**	**1,35**	**1,57**	**1,44**
Op2	-3,70	86,32	42,09	0,999	35,81	32,14	28,35	24,75
	-3,52	92,35	41,48	0,997	33,67	31,81	28,38	25,09
	-3,48	93,80	41,26	0,999	35,30	31,92	28,37	24,88
	-3,43	95,68	40,81	0,996	34,71	31,80	28,07	24,67
Media	**-3,53**	**92,04**	**41,41**	**0,998**	**34,87**	**31,92**	**28,29**	**24,85**
DS	**0,12**	**4,05**	**0,53**	**0,002**	**0,92**	**0,16**	**0,15**	**0,18**
CV%	**3,33**	**4,40**	**1,29**	**0,150**	**2,64**	**0,49**	**0,53**	**0,74**

Tabella 36: Risultati delle curve di calibrazione per il gene *JAK2* WT eseguite da Op1 e Op2. Sono riportati i valori di slope, efficienza, intercetta, R^2 e valori medi di Ct per i quattro standard analizzati. Per entrambi gli operatori i parametri risultano in linea con i valori attesi, con slope prossimi a -3,3 e R^2 costantemente ≥0,99. Le deviazioni standard (DS) in valore assoluto e i coefficienti di variazione (CV%) sono contenuti, a conferma della buona riproducibilità intra-operatore.

Tutti i risultati statistici ottenuti sono stati riassunti nella tabella 37.

	t	df	p-value	IC 95% (ΔOp1 - Op2)	Significativo
Slope	0,667	4	0,54	[-0,1380 ; 0,2252]	No
Efficienza %	0,667	4	0,54	[-4,8392; 7,9020]	No
Intercetta	0,180	5	0,86	[-0,8503 ; 0,7391]	No
R2	0,879	9	0,40	[-0,00347 ; 0,00153]	No
Ct St1	1,144	3	0,34	[-0,9730 ; 2,0658]	No
Ct St2	0,358	10	0,73	[-0,2914 ; 0,4031]	No
Ct St3	0,683	10	0,51	[-0,2507 ; 0,4723]	No
Ct St4	0,901	10	0,39	[-0,1966 ; 0,4639]	No

Tabella 37: Confronto dei parametri delle curve di calibrazione di *JAK2* WT tra due operatori (Op1 e Op2). Sono riportati i valori del test *t*, i gradi di libertà (df), il p-value e gli intervalli di confidenza al 95% per *slope*, intercetta, R^2 e Ct dei quattro standard.

I dati relativi a *JAK2* WT mostrano che le analisi effettuate dai due operatori (Op1 e Op2) sono altamente coerenti.

Le medie degli slope, delle intercette, dell'efficienza % e dei valori Ct dei quattro standard sono simili tra operatori, con coefficienti di variazione (CV%) generalmente inferiori al 5%. In particolare, le

medie di efficienza si mantengono vicine al 100%, indicando una corretta amplificazione dei target e la robustezza del metodo.
L'analisi statistica tramite test *t* tra Op1 e Op2 (Tabella 37) non evidenzia differenze significative per nessuno dei parametri analizzati (slope, intercetta, efficienza %, R^2 e Ct degli standard; $p > 0,05$), confermando la stabilità e l'affidabilità del metodo.

Sono state condotte analisi anche per *JAK2* (Tabella 38) e WT (Tabella 40), con l'obiettivo di completare l'analisi di riproducibilità e robustezza del metodo in relazione alla variabilità potenzialmente associata ai diversi lotti.
I dati a disposizione per questi target molecolari hanno permesso di condurre un'analisi statistica, grazie alla disponibilità di un numero adeguato di osservazioni per ciascun lotto (7 per il lotto 12433999 utilizzato nelle prime sedute e 9 per il lotto 12730749 nelle sedute successive).

Analogamente a quanto fatto per il confronto operatore-dipendente di *BCR-ABL1*, per *JAK2* e WT è stato effettuato un confronto tra i due lotti di standard, analizzando i principali parametri delle curve (slope, intercetta, efficienza, R^2 e valori medi di Ct per gli standard St1–St6), al fine di evidenziare eventuali differenze legate ai reagenti.
L'analisi è stata condotta mediante test *t di Welch* a due code per gruppi indipendenti, considerando significative le differenze con p-value $< 0,05$. In tabella sono riportati i valori medi, la deviazione standard e il coefficiente di variazione (CV%) di ciascun parametro, insieme all'esito del test statistico (t di Student, gradi di libertà, p-value, intervallo di confidenza al 95% e indicazione della significatività).

	V617F							
	Slope	Efficienza %	Intercetta	R2	Ct St1 Media	Ct St2 Media	Ct St3 Media	Ct St4 Media
Lotto 12433999	-3,45	94,92	42,56	0,995	36,55	32,52	29,67	26,33
	-3,46	94,54	41,87	0,998	35,93	32,55	29,14	25,53
	-3,49	93,43	42,68	0,995	36,84	33,21	29,55	26,41
	-3,28	101,78	41,79	0,996	36,10	33,08	29,80	26,28
	-3,54	91,64	43,11	0,997	37,22	33,43	29,86	26,60
	-3,55	91,29	42,99	0,998	36,97	33,37	29,88	26,30
	-3,59	89,91	43,31	0,998	37,44	33,45	30,03	26,50
Media	**-3,57**	**90,60**	**43,15**	**0,998**	**37,21**	**33,41**	**29,96**	**26,40**
DS	**0,03**	**0,97**	**0,23**	**0,000**	**0,33**	**0,06**	**0,11**	**0,14**
CV	**0,79**	**1,08**	**0,52**	**0,000**	**0,89**	**0,17**	**0,35**	**0,54**
Lotto 12730749	-3,51	92,71	42,77	0,997	36,60	33,52	29,71	26,29
	-3,79	83,59	43,69	0,995	37,45	33,33	29,37	26,15
	-3,66	87,60	43,49	0,985	37,27	33,63	29,91	26,31
	-3,79	83,59	43,93	0,997	37,66	33,48	29,84	26,24
	-3,65	87,92	43,72	0,995	37,53	33,93	30,00	26,66
	-3,43	95,68	42,96	0,997	36,99	34,00	30,18	26,84
	-3,23	103,98	42,45	0,997	36,87	33,91	30,36	27,28
	-3,29	101,35	42,02	0,994	36,26	33,43	29,81	26,51
	-3,40	96,84	42,43	0,996	36,49	33,45	30,01	26,32
Media	**-3,35**	**99,10**	**42,23**	**0,995**	**36,38**	**33,44**	**29,91**	**26,42**
DS	**0,08**	**3,19**	**0,29**	**0,001**	**0,16**	**0,01**	**0,14**	**0,13**
CV	**2,33**	**3,22**	**0,69**	**0,142**	**0,45**	**0,04**	**0,47**	**0,51**

Tabella 38: Confronto lotto-dipendente per *JAK2* e WT. Sono riportati i valori medi, deviazione standard (DS) in valore assoluto e coefficiente di variazione (CV%) dei parametri delle curve standard (slope, intercetta, efficienza, R^2 e Ct medi per gli standard St1–St6) ottenuti con il lotto 12433999 (n = 7) e il lotto 12730749 (n = 9).

Tutti i risultati statistici ottenuti sono stati riassunti nella tabella 39.

	t	df	p-value	IC 95% (ΔOp1 - Op2)	Significativo
Slope	0,60	12	0,56	[-0,1240; 0,2196]	No
Efficienza %	0,46	12	0,65	[-4,9432; 7,6344]	No
Intercetta	1,36	13	0.19	[-1,1251; 0,2543]	No
R2	1,40	10	0,19	[-0,00114; 0,00501]	No
Ct St1	1,08	12	0,30	[-0,8776; 0,2938]	No
Ct St2	3,15	9	0,01	[-0,9338; -0,1541]	Si
Ct St3	0,87	13	0,38	[-0,5054; 0,2140]	No
Ct St4	1,30	13	0,22	[-0,6193; 0,1543]	No

Tabella 39: Risultati del test *t* di Welch a due code per il confronto lotto-dipendente di WT. Sono riportati, per ciascun parametro delle curve standard (slope, efficienza %, intercetta, R^2 e valori medi di Ct per gli standard St1–St4), i valori del t di Student, i gradi di libertà (df), il p-value, l'intervallo di confidenza al 95% della differenza tra i lotti e l'indicazione di significatività statistica ($p < 0,05$).

Per il target V617F, il confronto tra i due lotti di standard non ha evidenziato differenze statisticamente significative per i parametri principali delle curve (slope, efficienza %, intercetta e R^2), i quali risultano in linea con i valori attesi e caratterizzati da una buona riproducibilità.

Anche i valori medi di Ct per gli standard St1, St3 e St4 non mostrano variazioni rilevanti tra i lotti. Unica eccezione è rappresentata dallo standard St2, per il quale il test *t* di Welch ha evidenziato una differenza statisticamente significativa (p = 0,01), suggerendo una possibile sensibilità lotto-dipendente limitata a questo punto della curva.

	WT							
	Slope	Efficienza %	Intercetta	R2	Ct St1 Media	Ct St2 Media	Ct St3 Media	Ct St4 Media
Lotto 12433999	-3,55	91,29	41,33	0,999	35,36	31,66	28,19	24,68
	-3,53	91,99	40,83	0,998	34,92	31,20	27,71	24,33
	-3,36	98,44	40,94	0,992	35,16	32,08	28,32	25,22
	-3,34	99,25	40,57	0,995	34,84	31,70	28,08	24,91
	-3,57	90,60	41,76	0,995	35,79	32,04	28,45	25,09
	-3,56	90,94	41,74	0,999	35,58	32,27	28,59	24,93
	-3,49	93,43	41,89	0,996	35,92	32,49	29,13	25,42
Media	**-3,53**	**92,19**	**41,82**	**0,998**	**35,75**	**32,38**	**28,86**	**25,18**
DS	**0,05**	**1,76**	**0,11**	**0,002**	**0,24**	**0,16**	**0,38**	**0,35**
CV%	**1,40**	**1,91**	**0,25**	**0,213**	**0,67**	**0,48**	**1,32**	**1,38**
Lotto 12730749	-3,67	87,27	42,23	0,996	35,98	32,37	28,55	25,02
	-3,70	86,32	42,09	0,999	35,81	32,14	28,35	24,75
	-3,52	92,35	41,48	0,997	33,67	31,81	28,38	25,09
	-3,48	93,80	41,26	0,999	35,30	31,92	28,37	24,88
	-3,34	99,25	40,83	0,997	35,04	32,02	28,40	25,11
	-3,46	94,54	41,69	0,998	35,79	32,37	28,92	25,40
	-3,34	99,25	41,15	0,996	35,26	32,43	28,79	25,34
	-3,43	95,68	40,81	0,996	34,71	31,80	28,07	24,67
	-3,54	91,64	41,44	0,999	35,41	31,95	28,24	24,85
Media	**-3,49**	**93,66**	**41,13**	**0,998**	**35,06**	**31,88**	**28,16**	**24,76**
DS	**0,08**	**2,86**	**0,45**	**0,002**	**0,49**	**0,11**	**0,12**	**0,13**
CV%	**2,23**	**3,05**	**1,08**	**0,213**	**1,41**	**0,33**	**0,43**	**0,51**

Tabella 40: Confronto lotto-dipendente per WT. Sono riportati i valori dei parametri delle curve standard (slope, efficienza %, intercetta, R^2 e valori medi di Ct per gli standard St1–St4) ottenuti con il lotto 12433999 (n = 7) e il lotto 12730749 (n = 9). Per ciascun lotto sono indicati i valori individuali, la media, la deviazione standard (DS) in valore assoluto e il coefficiente di variazione (CV%).

Tutti i risultati statistici ottenuti sono stati riassunti nella tabella 41.

	t	df	p-value	IC 95% (ΔOp1 - Op2)	Significativo
Slope	0,21	13	0,83	[-0,1086; 0,1327]	No
Efficacia %	0,17	13	0,86	[-4,0700; 4,7926]	No
Intercetta	0,57	12	0,57	[-0,7101; 0,4148]	No
R2	1,09	8	0,31	[-0,00362; 0,00130]	No
Ct St1	0,52	13	0,61	[-0,4644; 0,7609]	No
Ct St2	0,93	9	0,38	[-0,5842; 0,2442]	No
Ct St3	0,52	9	0,61	[[-0,5284; 0,3297]	No
Ct St4	0,45	10	0,66	[-0,4271; 0,2827]	No

Tabella 41: Risultati del test *t* di Welch a due code per il confronto tra operatori (Op1 vs Op2) per *JAK2* V617F. Sono riportati i valori del t di Student, i gradi di libertà (df), il p-value, l'intervallo di confidenza al 95% della differenza tra operatori e l'indicazione di significatività statistica ($p < 0,05$) per i parametri delle curve standard e per i valori medi di Ct dei quattro standard.

I risultati relativi a WT mostrano che le curve di calibrazione ottenute con i due lotti di standard (12433999 e 12730749) sono sostanzialmente sovrapponibili. Le medie delle slope, delle intercette, dell'efficienza % e dei valori Ct dei quattro standard evidenziano una buona riproducibilità, con coefficienti di variazione (CV%) generalmente inferiori al 5%.

L'analisi statistica mediante test *t* di Welch non ha evidenziato differenze significative tra i due lotti per nessuno dei parametri considerati (p-value > 0,05), indicando che le differenze osservate rientrano nella normale variabilità tecnica.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

L'analisi sperimentale condotta ha permesso di analizzare l'efficacia, la robustezza e la riproducibilità delle metodiche presentanti Real Time PCR (Polymerase Chain Reaction), metodica utilizzata nello specifico della diagnostica molecolare per le neoplasie mieloproliferative.

Partendo da campioni di routine destinati al rilevamento o al monitoraggio clinico di mutazioni responsabili dell'insorgenza di patologie mieloproliferative, sono stati analizzati i dati ricavati dalle sedute di amplificazione del materiale genetico, rispettivamente RNA retrotrascritto e DNA genomico.

In questo modo è stato possibile eseguire un'analisi dettagliata delle prestazioni analitiche valutando slope, efficienza di reazione, il coefficiente di determinazione R^2 e valori medi di Ct per i differenti livelli di standard. Gli stessi parametri sono stati esaminati sia intra-seduta (ripetibilità) sia inter-seduta (riproducibilità nel tempo), con l'obiettivo di valutare la solidità del metodo in differenti condizioni operative ma pur sempre controllate. I risultati ottenuti per il trascritto ***BCR-ABL1* p210** hanno mostrato un'elevata stabilità dei parametri analizzati, (efficienza tra 92% e 101%, slope media pari a -3,37 e R^2 costantemente >0,99). Conclusioni analoghe si possono trarre anche per il gene di controllo ABL1, utilizzato come riferimento interno per monitorare la buona riuscita dell'analisi e per il quale è stato confermato un'ottimale linearità nei risultati (valori di R^2 medi pari a 0,998 e slope media di -3,39).

Tali valori rispettano pienamente le soglie indicate dalle linee guida internazionali (MIQE guidelines)[59], che raccomandano per le curve standard un'efficienza di reazione compresa tra il 90 e il 110%, uno slope compreso tra –3,1 e –3,6 e un coefficiente di determinazione (R^2) ≥ 0,99. Ciò conferma che la metodologia impiegata soddisfa i requisiti internazionalmente riconosciuti per l'analisi quantitativa tramite RT-qPCR.

La variabilità intra seduta non ha evidenziato differenze sostanziali, se non per lo Standard1 (St1) il quale ha riportato delle variazioni dovute al numero limitato di copie presenti nello standard stesso.

La maggiore variabilità osservata nello standard 1, sia per *BCR-ABL1* che per ABL1, è coerente con quanto riportato in letteratura: l'uso di diluizioni estremamente basse può aumentare l'instabilità dei risultati[60]. Tali valori, sebbene non impattanti nell'interpretazione finale, suggeriscono l'opportunità di trattare lo St1 con cautela o escluderlo nelle valutazioni critiche di validità analitica. Per questo motivo nel gene di controllo ABL1 lo standard1 non è stato inserito nell'analisi.

Allo stesso modo, anche l'analisi della variabilità inter-seduta ha dimostrato valori di deviazione standard e coefficiente di variazione contenuti. In particolare, per il trascritto p210 *BCR-ABL1* i valori di CV% sono sempre risultati inferiori al 2,1%, mentre per il gene di controllo ABL1 si osserva una

variabilità leggermente più marcata (fino al 3,5%), soprattutto nelle diluizioni più basse. Tali oscillazioni, pur richiedendo un monitoraggio nel tempo, rientrano comunque nei limiti di accettabilità della metodica utilizzata poiché il CV% non supera il valore del 5%. Questi dati evidenziano l'efficacia e la robustezza del protocollo di amplificazione utilizzato.

L'ulteriore analisi statistica condotta ha permesso inoltre di escludere differenze significative legate alla variabilità operatore-dipendente. Il confronto tra le sedute eseguite da due operatori distinti non ha evidenziato variazioni statisticamente significative nei parametri analizzati. Tutti i p-value ottenuti dall'applicazione del test di Welch sono risultati maggiori rispetto alla soglia convenzionale di significatività, fissata a 0,05.

Per quanto riguarda la variabilità lotto-dipendente, l'analisi ha mostrato una buona riproducibilità dei parametri analitici. I valori medi e i coefficienti di variazione risultano contenuti, confermando la stabilità delle misurazioni. Alcuni lotti con poche sedute (00140 per *BCR-ABL1* e 02202 per ABL1) mostrano lievi scostamenti, comunque entro limiti accettabili. Per questi lotti non è stato possibile applicare un test statistico formale, ma i dati descrittivi indicano che la variabilità non compromette la validità del metodo, evidenziando l'importanza di un monitoraggio costante dei materiali di consumo.

L'utilizzo del gene ABL1 come controllo endogeno è risultato essere uno strumento efficace per monitorare l'efficienza dell'estrazione, la qualità dell'RNA e l'efficienza dell'amplificazione. L'inserimento di tale gene all'interno della seduta ha contribuito alla riduzione e alla rilevazione della presenza di eventuali falsi negativi. Inoltre, il suo impiego permette di normalizzare la quantificazione del trascritto *BCR-ABL1* rispetto a un gene costitutivamente espresso, rendendo possibile la valutazione nel tempo della percentuale di trascritto e il monitoraggio della malattia minima residua.

Nel complesso, i risultati ottenuti attestano la validità, l'affidabilità e la robustezza del metodo di quantificazione del trascritto *BCR-ABL1* p210 e del gene di controllo ABL1. La bassa variabilità osservata nei parametri tecnici e la mancanza di differenze statisticamente significative tra operatori e lotti conferiscono solidità alle misurazioni effettuate. Tali evidenze pongono le basi per una sua applicazione affidabile nella pratica diagnostica e nel follow-up terapeutico suggerendo al contempo alcuni ambiti di ottimizzazione futura. In particolare, i risultati ottenuti suggeriscono di prestare maggiore attenzione alle diluizioni estremamente basse (Standard 1), che tendono a mostrare una variabilità più marcata. Allo stesso tempo, potrebbe essere utile affiancare ad ABL1 altri geni di riferimento, così da rendere la normalizzazione ancora più solida e ridurre l'impatto della sua lieve variabilità. Infine, un monitoraggio costante della possibile variabilità legata ai diversi lotti di reagenti rappresenta un aspetto importante per garantire nel tempo la massima affidabilità delle misurazioni.

Per quanto riguarda la mutazione ***JAK2* V617F** e il corrispettivo allele **WT**, i dati hanno confermato l'affidabilità del metodo anche su questi target.
I parametri analitici analizzati hanno dimostrato una buona stabilità (efficienza compresa tra l'86% e il 103%, slope media pari a – 3,50, R^2 con valori compresi tra 0.992 e 0,999).
Rispetto al target wild type, il target mutato V617F ha mostrato una maggiore variabilità nei parametri analitici, soprattutto nei valori di efficienza, che supera talvolta i limiti di accettabilità (CV% > 5%). È importante sottolineare che questa maggiore variabilità riguarda in particolare gli standard con basso numero di copie di allele mutato o wild-type, i quali risultano essere più sensibili a piccole fluttuazioni tecniche. Questa evidenza è da associare alla natura della mutazione stessa: trattandosi infatti di una mutazione puntiforme somatica e clonale essa può essere presente in bassa quantità nei campioni e quindi risulta essere più sensibile a eventuali fluttuazioni tecniche della metodica stessa. Questa osservazione è coerente con studi precedenti che sottolineano la difficoltà tecnica nel rilevare mutazioni puntiformi a bassa frequenza allelica[61]. Aspetto fondamentale che va tenuto in considerazione soprattutto in realtà diagnostiche dove anche minime variazioni possono dimostrarsi significative.
Per quanto riguarda la precisione intra-seduta, i dati si sono mantenuti complessivamente stabili per entrambi i target. Le deviazioni standard e i coefficienti di variazione sono risultati contenuti, soprattutto per il *JAK2* WT, dove raramente si sono superati valori dell'1-1,5%. Per il V617F si sono osservati alcuni picchi isolati, soprattutto per lo standard 1, ma come già riportato in precedenza ciò è dovuto alla bassa concentrazione dello standard. Tutti i valori riscontrati rientrano nei limiti considerati accettabili, seppur con qualche minima oscillazione.
L'analisi della variabilità inter-seduta ha confermato una buona stabilità e ripetibilità del metodo. I valori medi di Ct sono risultati coerenti da una seduta all'altra con differenze minime all'interno delle diverse sedute; i valori di DS e di CV% risultano essere molto bassi, con CV% ≤ 0,09% per *JAK2* V617F e tra 1,03% e 1,60% per *JAK2* WT, indicando una variabilità minima per tutti i livelli in entrambi i target.
Per quanto riguarda l'efficienza, si è notato come le rette dell'allele wild type presentino andamenti più regolari e costanti, a differenza delle rette del target mutato le quali risultano leggermente più instabili, con qualche seduta in cui l'efficienza o supera il 100% o scende sotto il 90%. Pur non essendo variazioni in grado di compromettere la validità delle sedute (limiti di accettabilità indicati dal kit: slope comprese tra –3.0 e –3.9, corrispondenti a efficienze tra 80,5% e 115,5%), risulta utile monitorare tali oscillazioni nel tempo. Questo perché un'efficienza leggermente minore può portare a sottostimare le copie del mutato, mentre un'efficienza più alta può causarne una sovrastima. Questo aspetto è particolarmente importante per i campioni con bassi carichi allelici, dove efficienze non ottimali possono influire sulla corretta quantificazione e sulla successiva diagnosi o follow-up.

L'analisi statistica relativa al monitoraggio della variabilità legata all'operatore ha evidenziato una sostanziale sovrapponibilità dei risultati, sia per *JAK2* V617F che per *JAK2* WT. I valori medi di slope, efficienza, intercetta, R^2 e Ct degli standard sono risultati simili tra i due operatori, con coefficienti di variazione contenuti (<5%) e senza differenze statisticamente significative ($p > 0,05$). Questo conferma che il metodo è riproducibile e affidabile indipendentemente da chi esegue le analisi. Analogamente, il confronto lotto-dipendente (12433999 vs 12730749) ha mostrato parametri delle curve standard stabili e riproducibili per entrambi i target. Per *JAK2* WT non sono state riscontrate differenze significative tra i due lotti, mentre per *JAK2* V617F l'unica discrepanza è stata osservata per lo standard St2 ($p = 0,01$), a indicare una possibile sensibilità limitata e circoscritta.
Complessivamente, i risultati indicano che il metodo è riproducibile, indipendentemente dall'operatore o dal lotto utilizzato, e può essere applicato in maniera sicura per analisi diagnostiche e monitoraggio clinico.

Nel complesso, lo studio dimostra che le metodiche qPCR applicate ai target *BCR-ABL1* p210, ABL1 e *JAK2* V617F, *JAK2* WT sono solide, riproducibili e robuste, con parametri analitici in linea con le raccomandazioni internazionali e prive di differenze significative legate all'operatore o al lotto di reagenti.
La maggiore variabilità dei valori di Ct osservata nei livelli più bassi di standard e nell'efficienza del target mutato V617F rappresenta una criticità attesa e già riportata in letteratura[61], ma non compromette la validità diagnostica complessiva.
Questi risultati confermano l'affidabilità del protocollo adottato nel contesto della diagnostica molecolare per le neoplasie mieloproliferative, garantendo una quantificazione accurata dei trascritti e un supporto clinico solido nella gestione terapeutica dei pazienti.
In prospettiva futura, oltre a mantenere monitorati questi indicatori di ripetibilità e riproducibilità del metodo, sarà utile integrare queste osservazioni con controlli di qualità multi-lotto più sistematici. La comparazione e validazione di metodiche di nuova generazione, come per esempio la digital PCR, può permettere di valutare la possibile riduzione della variabilità residua e il miglioramento della sensibilità nel rilevamento di mutazioni a bassa frequenza.

BIBLIOGRAFIA:

1. Cavé H. The polymerase chain reaction, so simple, so clever: the discovery that made minimal residual disease come true. Haematologica. 1 agosto 2022;107(8):1737–8.

2. Valentini O, Milanesi B. Analisi quantitativa in biologia molecolare.

3. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnol Nat Publ Co. settembre 1993;11(9):1026–30.

4. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987;155:335–50.

5. QIAamp RNA Blood Mini Kit | Blood RNA Extraction | QIAGEN [Internet]. [citato 18 luglio 2025]. Disponibile su: https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/total-rna/qiaamp-rna-blood-mini-kit

6. ipsogen *JAK2* MutaSearch Kit [Internet]. [citato 18 luglio 2025]. Disponibile su: https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/oncology/ipsogen-leukemia/ipsogen-*JAK2*-mutasearch-kit

7. Chesher D. Evaluating assay precision. Clin Biochem Rev. agosto 2008;29 Suppl 1(Suppl 1):S23-26.

8. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. aprile 2009;55(4):611–22.

9. Oosterhuis WP, Bayat H, Armbruster D, Coskun A, Freeman KP, Kallner A, et al. The use of error and uncertainty methods in the medical laboratory. Clin Chem Lab Med. 26 gennaio 2018;56(2):209–19.

10. Taylor SC, Nadeau K, Abbasi M, Lachance C, Nguyen M, Fenrich J. The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. Trends Biotechnol. luglio 2019;37(7):761–74.

11. White GH. Basics of estimating measurement uncertainty. Clin Biochem Rev. agosto 2008;29 Suppl 1(Suppl 1):S53-60.

12. Biostatistica [Internet]. Edizioni Idelson Gnocchi. [citato 2 settembre 2025]. Disponibile su: https://www.idelsongnocchi.com/shop/prodotto/biostatistica-seconda-edizione/

13. Thapa B, Fazal S, Parsi M, Rogers HJ. Myeloproliferative Neoplasms. In: StatPearls [Internet] [Internet]. StatPearls Publishing; 2023 [citato 10 giugno 2025]. Disponibile su: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531464/

14. Morsia E, Torre E, Poloni A, Olivieri A, Rupoli S. Molecular Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: From Molecular Landscape to Therapeutic Implications. Int J Mol Sci. gennaio 2022;23(9):4573.

15. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood. 1 ottobre 2002;100(7):2292–302.

16. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. Blood. 15 settembre 2022;140(11):1200–28.

17. Hochman MJ, Smith BD, Karantanos T, Braunstein EM, Gojo I, Jain T, et al. Chronic myeloid leukemia (CML) evolves from Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs) with unexpected frequency. Int J Hematol. marzo 2023;117(3):456–62.

18. Eden RE, Coviello JM. Chronic Myelogenous Leukemia. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [citato 10 giugno 2025]. Disponibile su: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531459/

19. Yeung CCS, Egan D, Radich JP. Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia: present and future. Expert Rev Mol Diagn. ottobre 2016;16(10):1083–91.

20. Greiner G, Ratzinger F, Gurbisz M, Witzeneder N, Taghizadeh H, Mustafa SGK, et al. Comparison of *BCR-ABL1* quantification in peripheral blood and bone marrow using an International Scale-standardized assay for assessment of deep molecular response in chronic myeloid leukemia. Clin Chem Lab Med. 28 luglio 2020;58(8):1214–22.

21. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. 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. 1 luglio 2006;108(1):28–37.

22. Branford S, Hughes TP, Rudzki Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. Br J Haematol. dicembre 1999;107(3):587–99.

23. Branford S. Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia—how low can you go? Hematology. 2 dicembre 2016;2016(1):156–63.

24. Braun TP, Eide CA, Druker BJ. Response and Resistance to *BCR-ABL1*-Targeted Therapies. Cancer Cell. 13 aprile 2020;37(4):530–42.

25. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. Blood. 8 agosto 2013;122(6):872–84.

26. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of *BCR-ABL1*–positive chronic myeloid leukemia. Blood. 19 febbraio 2009;113(8):1619–30.

27. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. Leukemia. aprile 2020;34(4):966–84.

28. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. Blood. 4 agosto 2011;118(5):1208–15.

29. Hasanova A, Asadov C, Karimova N, Shirinova A, Aliyeva G, Alimirzoyeva Z. Spectrum of BCR-ABL mutations in Azerbaijanian imatinib-resistant patients with chronic myeloid leukemia. Pathol Oncol Res. 22 dicembre 2023;29:1611518.

30. Senapati J, Sasaki K, Issa GC, Lipton JH, Radich JP, Jabbour E, et al. Management of chronic myeloid leukemia in 2023 – common ground and common sense. Blood Cancer J. 24 aprile 2023;13(1):1–12.

31. Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Maru Y, Witte ON. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. Cell. 12 luglio 1991;66(1):161–71.

32. Telegeev GD, Dubrovska AN, Dybkov MV, Maliuta SS. Influence of BCR/ABL fusion proteins on the course of Ph leukemias. Acta Biochim Pol. 2004;51(3):845–9.

33. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Chronic Myeloid Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002 [citato 6 settembre 2025]. Disponibile su: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65916/

34. Roukos V, Burman B, Misteli T. The cellular etiology of chromosome translocations. Curr Opin Cell Biol. giugno 2013;25(3):357–64.

35. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of *BCR-ABL1*-positive chronic myeloid leukemia. Blood. 19 febbraio 2009;113(8):1619–30.

36. Melo JV. The Diversity of BCR-ABL Fusion Proteins and Their Relationship to Leukemia Phenotype. Blood. 1 ottobre 1996;88(7):2375–84.

37. Press RD, Kamel-Reid S, Ang D. *BCR-ABL1* RT-qPCR for Monitoring the Molecular Response to Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. J Mol Diagn. 1 settembre 2013;15(5):565–76.

38. Cross NCP, White HE, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. Leukemia. maggio 2015;29(5):999–1003.

39. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. Leukemia. aprile 2020;34(4):966–84.

40. Cross NCP, White HE, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. Leukemia. maggio 2015;29(5):999–1003.

41. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. Leukemia. aprile 2020;34(4):966–84.

42. Le neoplasie mieloproliferative Ph-negative: il ruolo dell'anatomopatologo [Ed. 2020] [Internet]. [citato 11 giugno 2025]. Disponibile su: https://fad.accmed.org/course/info.php?id=125

43. Al-Mashdali AF, Aldapt MB, Rahhal A, Hailan YM, Elhakeem I, Ali EA, et al. Pediatric Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms in the Era of WHO Classification: A Systematic Review. Diagnostics. gennaio 2023;13(3):377.

44. Wang Y, Ran F, Lin J, Zhang J, Ma D. Genetic and Clinical Characteristics of Patients with Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasm Carrying Concurrent Mutations in *JAK2*V617F, CALR, and MPL. Technol Cancer Res Treat. 1 gennaio 2023;22:15330338231154092.

45. Kang MG, Choi HW, Lee JH, Choi YJ, Choi HJ, Shin JH, et al. Coexistence of *JAK2* and CALR mutations and their clinical implications in patients with essential thrombocythemia. Oncotarget. 30 luglio 2016;7(35):57036–49.

46. Gnanasambandan K, Sayeski PP. A structure-function perspective of *JAK2* mutations and implications for alternate drug design strategies: the road not taken. Curr Med Chem. 2011;18(30):4659–73.

47. Xin P, Xu X, Deng C, Liu S, Wang Y, Zhou X, et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. Int Immunopharmacol. marzo 2020;80:106210.

48. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. Immunol Rev. marzo 2009;228(1):273–87.

49. Tabassum N, Saboor M, Ghani R, Moinuddin M. Frequency of *JAK2* V617F mutation in patients with Philadelphia positive Chronic Myeloid Leukemia in Pakistan. Pak J Med Sci. gennaio 2014;30(1):185–8.

50. Moliterno AR, Kaizer H, Reeves BN. *JAK2* V617F allele burden in polycythemia vera: burden of proof. Blood. 20 aprile 2023;141(16):1934–42.

51. Tabassum N, Saboor M, Ghani R, Moinuddin M. Frequency of *JAK2* V617F mutation in patients with Philadelphia positive Chronic Myeloid Leukemia in Pakistan. Pak J Med Sci. 2014;30(1):185–8.

52. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature. aprile 2005;434(7037):1144–8.

53. Regimbeau M, Mary R, Hermetet F, Girodon F. Genetic Background of Polycythemia Vera. Genes. aprile 2022;13(4):637.

54. Lu Y, Lin L, Lin J, Wu B, Cai G, Wang X, et al. Superior detection of low-allele burden Janus kinase 2 V617F mutation and monitoring clonal evolution in myeloproliferative neoplasms using chip-based digital PCR. Ann Hematol. settembre 2024;103(9):3553–62.

55. Lay M, Mariappan R, Gotlib J, Dietz L, Sebastian S, Schrijver I, et al. Detection of the *JAK2* V617F mutation by LightCycler PCR and probe dissociation analysis. J Mol Diagn JMD. luglio 2006;8(3):330–4.

56. Langabeer SE. Reduction in molecular diagnostics of myeloproliferative neoplasms during the COVID-19 pandemic. Ir J Med Sci. 2021;190(1):27–8.

57. Gong JZ, Cook JR, Greiner TC, Hedvat C, Hill CE, Lim MS, et al. Laboratory Practice Guidelines for Detecting and Reporting *JAK2* and MPL Mutations in Myeloproliferative Neoplasms: A Report of the Association for Molecular Pathology. J Mol Diagn. 1 novembre 2013;15(6):733–44.

58. Iudchenko A. Peripheral Blood Processing - Discover The Universe Within a Blood Tube [Internet]. Audubon Bioscience. 2021 [citato 18 luglio 2025]. Disponibile su: https://audubonbio.com/blog/a-universe-within-a-blood-tube-peripheral-blood-and-its-components/

59. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clin Chem. 1 aprile 2009;55(4):611–22.

60. Forootan A, Sjöback R, Björkman J, Sjögreen B, Linz L, Kubista M. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). Biomol Detect Quantif. giugno 2017;12:1–6.

61. Liu Y, Han C, Li J, Xu S, Xiao Z, Guo Z, et al. Laboratory-developed Droplet Digital PCR Assay for Quantification of the *JAK2*V617F Mutation. Glob Med Genet. 4 aprile 2024;11:132–41.