



ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALY

Offices: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E. mail: emd.support@elitechgroup.com
WEB site: www.elitechgroup.com

NOTICE of CHANGE dated 28/11/2023

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«BCR-ABL P190 ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTSG07PLD190

This new revision of the Instruction for Use (IFU) contains the following changes:

- Updated calibration curve validity (60 days)
- Updated transport and storage conditions for primary sample

The product can be used with the previous versions of the IFU as well.

Composition, use and performance of the product remain unchanged

PLEASE NOTE



LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT



THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT



CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT



LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT



A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT



DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



BCR-ABL P190 ELITE MGB® Kit
réactifs pour la transcription inverse de l'ARN
et l'amplification en temps réel de l'ADNc

REF RTSG07PLD190

BCR-ABL P190 ELITE MGB® Kit
réactifs pour la transcription inverse de l'ARN et
l'amplification en temps réel de l'ADNc

REF RTSG07PLD190



TABLE DES MATIÈRES

APPLICATION	page 1
PRINCIPE DU TEST	page 2
DESCRIPTION DU PRODUIT	page 3
MATÉRIEL FOURNI	page 4
MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI	page 4
AUTRES PRODUITS REQUIS	page 4
AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	page 5
ELITE INGENIUS®	page 7
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 7
PROCÉDURE	page 8
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	page 17
AUTRES SYSTÈMES	page 19
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 19
PROCÉDURE	page 20
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	page 29
BIBLIOGRAPHIE	page 31
LIMITES DE LA PROCÉDURE	page 32
PROBLÈMES ET SOLUTIONS	page 33
LÉGENDE DES SYMBOLES	page 35
NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE	page 36

APPLICATION

Le produit « **BCR-ABL P190 ELITE MGB® Kit** » est un test qualitatif et quantitatif de transcription inverse et d'amplification d'acides nucléiques pour la **détection de l'ARNm du réarrangement BCR-ABL, translocation t(9; 22), chromosome Philadelphia, variant P190 (P190)** et la **quantification de l'ARNm de P190 par rapport à l'ARNm du gène codant pour la protéine kinase Abelson (ABL)** dans des échantillons d'ARN total extraits de suspensions lymphomonocytaires et leucocytaires issues d'échantillons cliniques de sang périphérique ou de moelle osseuse.

Le produit est destiné à être utilisé, parallèlement aux données cliniques des patients et à d'autres tests de laboratoire, pour aider au diagnostic et à la surveillance des cas de leucémie myéloïde chronique (LMC), de leucémie myéloïde aiguë (LMA) et de leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) positive pour le marqueur P190.

PRINCIPE DU TEST

Le test consiste en une transcription inverse et une réaction d'amplification en temps réel (méthode en une seule étape) effectuée par un thermostat programmable doté d'un système optique de détection de fluorescence (thermocycleur d'amplification en temps réel).

Pour chaque échantillon d'ARN extrait, le test implique **une réaction spécifique en double pour une région d'ARNm de P190 (cible) et une réaction spécifique en double pour une région d'ARNm d'ABL (contrôle)**.

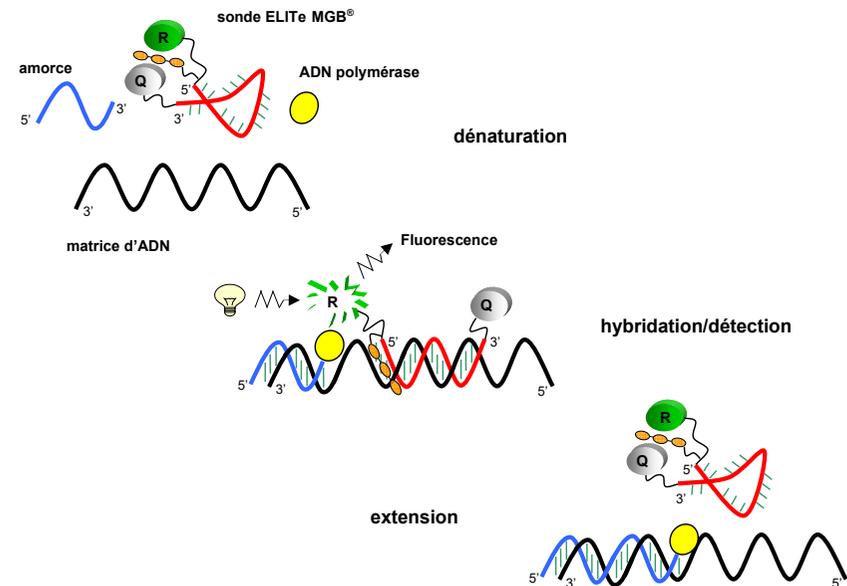
La sonde spécifique à l'ADNc de P190 dotée de la technologie ELITE MGB®, marquée par le fluorophore FAM, est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit spécifique de la réaction d'amplification de l'ADNc de P190.

La sonde spécifique à l'ADNc d'ABL dotée de la technologie ELITE MGB®, marquée par le fluorophore FAM, est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit spécifique de la réaction d'amplification de l'ADNc d'ABL.

Lorsque le produit spécifique de la réaction d'amplification augmente, l'émission de fluorescence augmente également et est mesurée et enregistrée par l'instrument. Le traitement des données détermine la présence et le titre de l'ARNm de P190 et d'ABL dans l'échantillon de départ.

Le test a été validé pour être utilisé en association avec les systèmes décrits dans le présent mode d'emploi.

L'image suivante présente le mécanisme d'activation et d'émission de fluorescence de la sonde utilisant la technologie ELITE MGB®. Noter que la sonde n'est pas hydrolysée pendant les cycles d'amplification.



DESCRIPTION DU PRODUIT

Le produit « **BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit** » fournit les composants suivants :

- **P190 PreMix**

Un mélange d'oligonucléotides, spécifique pour la transcription inverse et l'amplification en temps réel de P190, dans une solution stabilisée, **aliquoté dans un tube à essai** (capuchon VIOLET), contenant **270 µl de solution**, une quantité suffisante pour effectuer au moins **36 tests** en association avec le système « **ELITe InGenius®** » et **50 tests** en association avec d'autres systèmes.

Des oligonucléotides amorces et la sonde spécifique à P190 (stabilisés par le groupe MGB®, marqués par le fluorophore FAM et désactivés par une molécule non fluorescente), spécifiques à une région de l'ARNm générée par le **variant de réarrangement BCR-ABL P190 (e1a2)**.

Le mélange réactionnel fournit le fluorophore AP593, utilisé à la place de ROX ou de CY5, en tant que référence passive pour la normalisation de la fluorescence.

- **ABL PreMix**

Un mélange d'oligonucléotides, spécifique pour la transcription inverse et l'amplification en temps réel d'ABL, dans une solution stabilisée, **aliquoté dans un tube à essai** (capuchon NEUTRE), contenant **270 µl de solution**, une quantité suffisante pour effectuer au moins **36 tests** en association avec le système « **ELITe InGenius®** » et **50 tests** en association avec d'autres systèmes.

Les oligonucléotides amorces et la sonde spécifique à ABL (stabilisés par le groupe MGB®, marqués par le fluorophore FAM et désactivés par une molécule non fluorescente) spécifiques à une région de l'ARNm du gène humain codant pour **ABL (exons a2a3)**.

Le mélange réactionnel fournit le fluorophore AP593, utilisé à la place de ROX ou de CY5, en tant que référence passive pour la normalisation de la fluorescence.

- **PCR MasterMix**

Un mélange de réactifs optimisés et stabilisés pour la transcription inverse et l'amplification en temps réel, **aliquoté dans 2 tubes à essai** (capuchon NEUTRE). Chaque tube contient **820 µl de solution**, une quantité suffisante pour effectuer au moins **36 tests** en association avec le système « **ELITe InGenius®** » et **50 tests** en association avec d'autres systèmes.

Le mélange réactionnel fournit le tampon, le chlorure de magnésium, les nucléotides triphosphates et l'enzyme Taq ADN polymérase avec activation thermique (Hot start).

- **RT EnzymeMix**

Un mélange de réactifs optimisés et stabilisés pour la transcription inverse, **aliquoté dans 2 tubes à essai** (capuchon avec un insert NOIR). Chaque tube contient **20 µl de solution**, une quantité suffisante pour effectuer **36 tests** en association avec le système « **ELITe InGenius®** » et **50 tests** en association avec d'autres systèmes.

Le mélange réactionnel fournit l'enzyme transcriptase inverse.

Le produit permet d'effectuer **18 déterminations en double de l'ARNm de P190 et 18 déterminations en double de l'ARNm d'ABL en association avec le système «ELITe InGenius®»,** en incluant les étalons et les contrôles.

Le produit permet d'effectuer **25 déterminations en double de l'ARNm de P190 et 25 déterminations en double de l'ARNm d'ABL en association avec le 7300 Real Time PCR System, le 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument et le 7900 Real-Time PCR System, en incluant les étalons et les contrôles, c'est-à-dire un nombre maximum de 19 échantillons cliniques** en une seule session d'analyse (dans des conditions optimales d'utilisation).

MATÉRIEL FOURNI

Composant	Description	Quantité	Classification des risques
P190 PreMix	Mélange d'oligonucléotides amorces/sonde Capuchon VIOLET	1 x 270 µl	-
ABL PreMix	Mélange d'oligonucléotides amorces/sonde Capuchon NEUTRE	1 x 270 µl	-
PCR MasterMix	Mélange de réactifs pour la transcription inverse et l'amplification en temps réel Capuchon NEUTRE	2 x 820 µl	-
RT EnzymeMix	Transcriptase inverse capuchon avec un insert NOIR	2 x 20 µl	-

MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI

- Hotte à flux laminaire.
- Gants non poudrés en nitrile jetables ou matériel similaire.
- Agitateur de type vortex.
- Microcentrifugeuse de paillasse (12 000 - 14 000 tr/min).
- Micropipettes et cônes stériles avec filtre pour les aérosols ou à déplacement positif (2-20 µl, 5-50 µl, 50-200 µl, 200-1 000 µl).
- Eau de qualité biologie moléculaire.
- Tube Sarstedt de 2,0 ml à capuchon vissant, à collerette (Sarstedt réf. 72.694.005).
- Microtubes en polypropylène de 1,5 ml pour la biologie moléculaire.
- Thermostat programmable avec système de détection optique de fluorescence, 7300 Real Time PCR System, 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ou 7900 Real-Time PCR System étalonné selon les instructions du fabricant.

AUTRES PRODUITS REQUIS

Les réactifs pour l'extraction de l'ARN des échantillons, les microplaques d'amplification et les étalons d'ADN en quantité connue **ne sont pas** inclus dans ce produit.

Pour l'analyse automatique des échantillons à l'aide de l'instrument « **ELITe InGenius** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT030), les produits génériques suivants sont requis : les cartouches d'extraction « **ELITe InGenius® SP RNA** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT034SPRNA), l'endonucléase « **ELITe InGenius DNase I** » (ELITechGroup S.p.A. INT034DNASE), le kit « **Dnase Tube Adapter Kit** » (réf. G6431-000), les consommables pour l'extraction et l'amplification des acides nucléiques à partir des échantillons biologiques « **ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT032CS), le conteneur à déchets « **ELITe InGenius® Waste Box** » (ELITechGroup S.p.A., réf. F2102-000), la cassette de PCR « **ELITe InGenius® PCR Cassette** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT035PCR) et les cônes de 300 µl « **300 µL Filter Tips Axygen** » (Axygen BioScience Inc., CA, États-Unis, réf. TF-350-L-R-S).

Pour l'extraction automatique de l'ARN, l'amplification et l'interprétation de l'analyse d'un échantillon, l'instrument « **ELITe InGenius** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT030) et les protocoles de test spécifiques suivants (ELITechGroup S.p.A.) sont requis :

- pour les calibrateurs « **BCR-ABL P190 ELITe_STD_P190** » et « **BCR-ABL P190 ELITe_STD_ABL** »,
- pour le contrôle positif d'amplification « **BCR-ABL P190 ELITe_PC** »,
- pour le contrôle négatif d'amplification « **BCR-ABL P190 ELITe_NC** »,
- pour l'analyse des échantillons « **BCR-ABL P190 ELITe_PBL_200_100** ».

Pour l'extraction de l'ARN des échantillons à analyser, utiliser un produit validé en laboratoire, tel que le système d'extraction automatique « **Maxwell® CSC** » (Promega, code AS6000) avec les réactifs **Maxwell® CSC RNA Blood Kit** (Promega, code AS1410) ou d'autres produits équivalents.

Avec un 7300 Real-Time PCR System ou un 7900 Real-Time PCR System, il est recommandé d'utiliser le produit générique « **MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate** » (Life Technologies, code N8010560), des microplaques comprenant des puits de 0,2 ml et des feuilles de scellage adhésives pour l'amplification en temps réel.

Avec un 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ou un 7900 Real-Time PCR System, il est recommandé d'utiliser le produit générique « **MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL** » (Life Technologies, code 4346906), des microplaques comprenant des puits de 0,1 ml et des feuilles de scellage adhésives pour l'amplification en temps réel.

Pour la détection et la quantification de l'ARNm de P190 et de l'ARNm d'ABL, il est nécessaire d'utiliser le produit « **BCR-ABL P190 - ELITe Positive Control** » (ELITechGroup S.p.A., réf. CTRG07PLD190), un contrôle positif d'ADN plasmidique.

Pour la détection et la quantification de l'ARNm de P190 et de l'ARNm d'ABL, il est nécessaire d'utiliser le produit « **BCR-ABL P190 ELITe Standard** » (ELITechGroup S.p.A., code STDG07PLD190), cinq dilutions d'ADN plasmidique de quantité connue, afin d'obtenir les courbes d'étalonnage de P190 et ABL.

Pour le pré-traitement du sang, utiliser un produit générique validé en laboratoire, tel que la solution de lyse cellulaire (Promega, réf. A7933), le tampon de lyse d'ARN (Promega, réf. Z3051) et du thioglycérol (Promega, réf. A208B-C) ou des réactifs équivalents (tel que la Solution A (Promega, réf. MC130A), la Solution B (Promega, réf. MC131A) et du thioglycérol (Promega, réf. MC132A).

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Ce produit est exclusivement réservé à une utilisation *in vitro*.

Avertissements et précautions d'ordre général

Manipuler et mettre au rebut tous les échantillons biologiques comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux. Éviter tout contact direct avec les échantillons biologiques. Éviter de provoquer des éclaboussures ou des pulvérisations. Le matériel qui a été en contact avec les échantillons biologiques doit être traité pendant au moins 30 minutes avec de l'hypochlorite de sodium à 3 % ou autoclavé pendant une (1) heure à 121 °C avant d'être mis au rebut.

Manipuler et mettre au rebut tous les réactifs et l'ensemble du matériel qui ont été utilisés pour réaliser le test comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux. Éviter tout contact direct avec les réactifs. Éviter de provoquer des éclaboussures ou des pulvérisations. Les déchets doivent être manipulés et éliminés dans le respect des normes de sécurité adéquates. Le matériel combustible jetable doit être incinéré. Les déchets liquides contenant des acides ou des bases doivent être neutralisés avant d'être éliminés.

Porter des vêtements et des gants de protection appropriés et se protéger les yeux et le visage.

Ne jamais pipeter les solutions avec la bouche.

Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer de produits cosmétiques dans les zones de travail.

Se laver soigneusement les mains après toute manipulation des échantillons et des réactifs.

Éliminer les réactifs restants et les déchets conformément aux réglementations en vigueur.

Lire attentivement toutes les instructions fournies avec le produit avant d'exécuter l'analyse.

Lors de l'exécution de l'analyse, suivre les instructions fournies avec le produit.

Ne pas utiliser le produit au-delà de la date de péremption indiquée.

Utiliser uniquement les réactifs fournis avec le produit et ceux recommandés par le fabricant.

Ne pas mélanger des réactifs provenant de lots différents.

Ne pas utiliser de réactifs commercialisés par d'autres fabricants.

Avertissements et précautions pour la biologie moléculaire

Les procédures de biologie moléculaire, telles que l'extraction d'acide nucléique, la transcription inverse, l'amplification et la détection, exigent d'être effectuées par du personnel qualifié et dûment formé pour éviter tout risque de résultats erronés – en particulier, ceux dus à la dégradation des acides nucléiques contenus dans les échantillons ou à la contamination des échantillons par les produits d'amplification.

Lorsque la session d'amplification est paramétrée manuellement, il est nécessaire de disposer de zones distinctes pour l'extraction/la préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification/la détection des produits d'amplification. Ne jamais introduire un produit d'amplification dans la zone réservée à l'extraction/la préparation des réactions d'amplification.

Lorsque la session d'amplification est paramétrée manuellement, il est nécessaire de disposer de blouses de laboratoire, de gants et d'outils utilisés exclusivement pour l'extraction/la préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification/la détection des produits d'amplification. Ne jamais transférer de blouses, de gants ni d'outils de laboratoire de la zone désignée pour l'amplification/la détection des produits d'amplification vers la zone désignée pour l'extraction/la préparation des réactions d'amplification.

Les échantillons doivent être exclusivement utilisés pour ce type d'analyse. Les échantillons doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les tubes contenant différents échantillons ne doivent jamais être ouverts en même temps. Les pipettes utilisées pour manipuler les échantillons doivent être exclusivement utilisées à cette fin spécifique. Les pipettes doivent être de type à déplacement positif ou être utilisées avec des cônes dotés d'un filtre pour les aérosols. Les cônes utilisés doivent être stériles, exempts de DNases et de RNases, et exempts d'ADN et d'ARN.

Les réactifs doivent être manipulés sous une hotte à flux laminaire. Les réactifs nécessaires à l'amplification doivent être préparés de manière à pouvoir être utilisés au cours d'une seule session. Les pipettes utilisées pour la manipulation des réactifs doivent être utilisées exclusivement à cette fin. Les pipettes doivent être de type à déplacement positif ou être utilisées avec des cônes dotés d'un filtre pour les aérosols. Les cônes utilisés doivent être stériles, exempts de DNases et de RNases, et exempts d'ADN et d'ARN.

Les produits d'amplification doivent être manipulés de manière à réduire la dispersion dans l'environnement afin d'éviter tout risque de contamination. Les pipettes utilisées pour la manipulation des produits d'amplification doivent être exclusivement utilisées à cette fin.

Avertissements et précautions spécifiques pour les composants

- **P190 PreMix**
Le mélange **P190 PreMix** doit être conservé à -20 °C dans l'obscurité.
Le mélange **P190 PreMix** peut être congelé et décongelé **six fois** au maximum : des cycles de congélation/décongélation supplémentaires risqueraient d'entraîner une réduction des performances du produit.
- **ABL PreMix**
Le mélange **ABL PreMix** doit être conservé à -20 °C dans l'obscurité.
Le mélange **ABL PreMix** peut être congelé et décongelé **six fois** au maximum : des cycles de congélation/décongélation supplémentaires risqueraient d'entraîner une réduction des performances du produit.
- **PCR MasterMix**
Le mélange **PCR MasterMix** doit être conservé à -20 °C.
Le mélange **PCR MasterMix** peut être congelé et décongelé **six fois** au maximum : des cycles de congélation/décongélation supplémentaires risqueraient d'entraîner une réduction des performances du produit.
- **RT EnzymeMix**
Le produit **RT EnzymeMix** doit être conservé à -20 °C.
Le produit **RT EnzymeMix** ne doit pas être exposé à des températures supérieures à -20 °C pendant plus de 10 minutes à **six reprises** au maximum.

ELITe InGenius®

ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES

Échantillons

Ce produit doit être utilisé avec les échantillons cliniques suivants :

Sang périphérique prélevé sur EDTA ou sur citrate de sodium

Le sang périphérique collecté dans de l'EDTA ou du citrate de sodium, utilisé pour la préparation des suspensions de lymphomonocytes et de leucocytes en vue de l'extraction de l'ARN, doit être collecté conformément aux directives du laboratoire, transporté et conservé à température ambiante (+21 ±5 °C) pendant 24 heures au maximum.

Ne pas congeler le sang périphérique afin d'éviter toute dégradation de l'ARN.

Avec du sang périphérique, il est conseillé de séparer les leucocytes conformément aux directives du laboratoire ou aux indications suivantes.

Transférer 10-14 ml de sang périphérique frais prélevé sur EDTA ou sur citrate de sodium dans un tube de 15 ml après l'avoir minutieusement mélangé par inversion. Centrifuger pendant 10 minutes à 3000 tr/min ; ajouter 5 ml de solution de lyse cellulaire (Promega, réf. A7933) dans un nouveau tube de 15 ml ; à l'aide d'une pipette de 1 ml, prélever la couche leucocyto-plaquettaire obtenue après centrifugation puis la transférer dans le tube de 15 ml contenant la solution de lyse ; aspirer et relâcher jusqu'à ce que les cellules se trouvent dans le tube et que la pipette ne contienne plus de matériel ; incuber à température ambiante pendant 10 minutes et mélanger par inversion (PAS D'AGITATION AU VORTEX) au moins 3-4 fois ; centrifuger à 3000 tr/min pendant 10 minutes.

Remarque : la quantité idéale de globules blancs est représentée, à l'échelle 1:1, sur l'image suivante.



Prélever le surageant et remettre en suspension dans 2 ml de solution de lyse cellulaire en le transférant dans un tube de 2 ml ; centrifuger à nouveau pendant environ 2 minutes à 3000 tr/min ; prélever le surageant avec précaution (veiller à éliminer toute trace de globules rouges au-dessus du culot de cellules) et remettre le culot en suspension dans 200 µl de solution de lyse (1 ml de tampon de lyse d'ARN, Promega, réf. Z3051 + 20 µl de 1-thioglycérol, Promega, réf. A208B-C).

Remarque : lorsque l'extraction des acides nucléiques est réalisée avec le système **ELITe InGenius** et le logiciel **ELITe InGenius®** version 1.3 (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **BCR-ABL P190 ELITe_PBL_200_100**. Ce protocole comprend le traitement de 200 µl d'échantillon et l'élué des acides nucléiques dans 100 µl.

Substances interférentes

L'ARN extrait ne doit pas contenir d'héparine, d'hémoglobine, de Ficoll®, d'éthanol ou de 2-propanol afin d'éviter l'inhibition et la possibilité de génération fréquente de résultats non valides.

Des quantités d'ARN supérieures à 2,0 µg par réaction pourraient inhiber la réaction de transcription inverse et l'amplification en temps réel.

Des quantités d'ADN génomique humain supérieures à 100 ng par réaction dans l'ARN extrait de l'échantillon risqueraient d'inhiber la réaction de transcription inverse et l'amplification en temps réel.

PROCÉDURE

La procédure d'utilisation du **BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit** avec le système **ELITe InGenius** comporte trois étapes :

- Vérification de la préparation du système,
- Paramétrage de la session,
- Examen et exportation des résultats.

Vérification de la préparation du système

Avant de commencer la session d'analyse, en se reportant à la documentation de l'instrument, il est nécessaire de :

- mettre le système **ELITe InGenius** en marche et sélectionner le mode « **CLOSED** » (FERMÉ) ;
- vérifier que les calibrateurs (**BCR-ABL P190 Q-PCR Standard**) ont été analysés, sont approuvés et ne présentent pas le statut (Status) Expiré en association avec le lot de réactifs d'amplification à utiliser. En l'absence de calibrateurs d'amplification approuvés ou valides, il convient de les analyser comme décrit aux paragraphes suivants,
- vérifier que les contrôles d'amplification (Contrôles, **BCR-ABL P190 Positive Control**, **BCR-ABL P190 Negative Control**) ont été analysés, sont approuvés et ne présentent pas le statut (Status) Expiré en association avec le lot de réactifs d'amplification à utiliser. En l'absence de contrôles d'amplification approuvés ou valides, il convient de les analyser comme décrit aux paragraphes suivants,
- choisir le type d'analyse, en suivant les instructions de l'interface graphique utilisateur (GUI) concernant le paramétrage de la session d'analyse et en utilisant les protocoles de test fournis par ELITechGroup S.p.A. Ces protocoles de DIV ont été spécifiquement validés avec les kits **ELITe MGB®**, l'instrument **ELITe InGenius** et la matrice indiquée.

Le protocole de test disponible pour tester des échantillons à l'aide du produit **BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit** est décrit dans le tableau ci-dessous.

Protocole de test pour le BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit			
Nom	Matrice	Indication du rapport	Caractéristiques
BCR-ABL P190 ELITe_PBL_200_100	Leucocytes du sang périphérique	% P190	Volume d'extraction initial : 200 µl Volume d'élué extrait : 100 µl Sonication : NON Contrôle interne : NON Volume de PCR Mix : 20 µl Volume initial de PCR de l'échantillon : 10 µl

Si le protocole de test d'intérêt n'est pas dans le système, contacter le service clientèle ELITechGroup local.

Paramétrage de la session

Le produit **BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit** peut être utilisé avec le système **ELITe InGenius** pour les opérations suivantes :

- A. Analyse intégrée (« Extract + PCR » [Extraction + PCR]),
- B. Analyse d'amplification (« PCR Only » [PCR uniquement]),
- C. Analyse d'étalonnage (« PCR Only » [PCR uniquement]),
- D. Analyse d'amplification du contrôle positif et négatif (« PCR Only » [PCR uniquement]).

Tous les paramètres nécessaires pour la session d'analyse sont inclus dans le protocole de test disponible sur l'instrument et sont automatiquement rappelés lorsque le protocole de test est sélectionné.

Remarque : le système **ELITe InGenius** peut être connecté au « serveur d'informations de localisation » (LIS) par lequel il est possible d'envoyer les informations relatives à la session de travail. Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

Avant de commencer la session d'analyse, il est absolument indispensable de procéder comme suit :

1. Décongeler les tubes à essai du mélange **P190 PreMix** (capuchon BLANC) et du mélange **ABL PreMix** (capuchon NEUTRE) nécessaires à la session d'analyse pendant 30 minutes à température ambiante (+18/25 °C), en se rappelant que le contenu de chaque tube à essai est suffisant pour effectuer

BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit

réactifs pour la transcription inverse de l'ARN et l'amplification en temps réel de l'ADNc

REF RTSG07PLD190

36 réactions. Agiter au vortex pendant 10 secondes à trois reprises, centrifuger les tubes pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond puis conserver les tubes sur de la glace.

2. Décongeler les tubes à essai du mélange **PCR MasterMix** (capuchon NEUTRE) nécessaires à la session d'analyse pendant 30 minutes à température ambiante (+18/25 °C), en se rappelant que le contenu de chaque tube à essai est suffisant pour effectuer **36 réactions**. Agiter au vortex pendant 10 secondes à trois reprises, centrifuger les tubes pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond puis conserver les tubes sur de la glace.

3. Sortir les tubes de **RT EnzymeMix** (capuchon avec un insert NOIR) nécessaires pour la session d'analyse, en se rappelant que le contenu de chaque tube est suffisant pour effectuer **36 réactions**. Agiter délicatement les tubes, centrifuger pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond puis conserver les tubes sur de la glace.

Remarque : le mélange **RT EnzymeMix** ne doit pas être exposé à des températures supérieures à -20 °C pendant plus de 10 minutes.

4. Préparer un tube à capuchon vissant de 2 ml (Sarstedt réf. 72.694.005, non inclus dans le kit) pour le **mélange réactionnel complet** et le marquer de manière reconnaissable avec un marqueur permanent.

5. Calculer les volumes des trois composants inclus dans le kit qui sont nécessaires à la préparation du **mélange réactionnel complet** :

a. Pour la calibration, suivre le tableau ci-dessous :

Cible	Nombre d'échantillons	PreMix	PCR MasterMix	RT EnzymeMix
P190	5	30 µl	90 µl	0,9 µl
ABL	3	20 µl	60 µl	0,6 µl

b. Pour les contrôles et les échantillons, suivre le tableau ci-dessous :

Nombre d'échantillons	P190 ou ABL PreMix	PCR MasterMix	RT EnzymeMix
1	15 µl	45 µl	0,5 µl
2	25 µl	75 µl	0,8 µl
3	40 µl	120 µl	1,2 µl

6. Préparer le **mélange réactionnel complet** en ajoutant les volumes calculés des trois composants au tube de 2 ml dédié.

7. Agiter **au vortex à basse vitesse** à trois reprises pendant 10 secondes, centrifuger pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond puis conserver le tube sur de la glace.

Remarque : le **mélange réactionnel complet** doit être utilisé dans les **5 heures** s'il est conservé dans le bloc réfrigéré. Le mélange réactionnel complet **ne peut pas** être conservé. Ce laps de temps permet d'effectuer 1 session de travail de 3,5 heures, et de commencer une deuxième session de travail.

Les principales opérations du paramétrage des trois types d'analyse sont décrites ci-dessous.

A. Analyse intégrée

Pour paramétrer l'analyse intégrée à partir des échantillons pré-traités, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

- Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
- Vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µl et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution extrait) est de 100 µl.
- Pour chaque « Track » (Position) d'intérêt, renseigner le « SampleID » (SID) (ID échantillon) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
- Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (c'est-à-dire BCR-ABL P190 ELITe_PBL_200_100).
- Vérifier que le « Protocol » (Protocole) affiché est : « Extract + PCR » (Extraction + PCR).
- Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Sample Position » (Position échantillons) est « Extraction Tube (bottom row) » (Tube d'extraction [ligne inférieure]). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit

réactifs pour la transcription inverse de l'ARN et l'amplification en temps réel de l'ADNc

REF RTSG07PLD190

7. Charger le **mélange réactionnel complet** sur le « Inventory Block » (Bloc inventaire) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

8. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

9. Charger la « PCR Cassette » (Cassette de PCR), les cartouches d'extraction « ELITe InGenius SP RNA » et la « ELITe InGenius DNase I », tous les consommables requis et les échantillons à extraire aux positions spécifiées à l'étape 8 en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.

10. Fermer le tiroir de l'instrument.

11. Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système **ELITe InGenius** permet à l'utilisateur de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : au terme de l'analyse, l'échantillon extrait restant dans le « Elution tube » (Tube d'élution) doit être retiré de l'instrument, bouché, identifié et conservé à -20 °C pendant un mois au maximum. Éviter tout déversement de l'échantillon extrait.

Remarque : au terme de l'analyse, les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR) contenant les produits de réaction et les autres consommables doivent être retirés de l'instrument et mis au rebut en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

Remarque : au terme de l'analyse, le **mélange réactionnel complet** peut être conservé dans le bloc réfrigéré en tenant compte de la durée maximum de 5 heures.

B. Analyse d'amplification

Pour paramétrer l'analyse d'amplification à partir d'ARN extrait, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

- Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
- Même si aucune extraction ne sera effectuée, vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initial) est de 200 µl et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'élution extrait) est de 100 µl.
- Pour chaque « Track » (Position) d'intérêt, renseigner le SID en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
- Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test) (c'est-à-dire BCR-ABL P190 ELITe_PBL_200_100).
- Sélectionner « PCR Only » (PCR uniquement) dans la colonne « Protocol » (Protocole).
- Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Sample Position » (Position échantillons) est « Elution Tube (bottom row) » (Tube d'élution [ligne inférieure]). Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le **mélange réactionnel complet** sur le « Inventory Block » (Bloc inventaire) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR) et les échantillons d'acide nucléique extraits en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit

réactifs pour la transcription inverse de l'ARN
et l'amplification en temps réel de l'ADNc

REF RTSG07PLD190

Au terme du processus, le système **ELITe InGenius** permet à l'utilisateur de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : au terme de l'analyse, l'échantillon extrait restant dans le « Elution tube » (Tube d'éluion) doit être retiré de l'instrument, bouché, identifié et conservé à -20 °C pendant un mois au maximum. Éviter tout déversement de l'échantillon extrait.

Remarque : au terme de l'analyse, les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR) contenant les produits de réaction et les autres consommables doivent être retirés de l'instrument et mis au rebut en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

Remarque : au terme de l'analyse, le **mélange réactionnel complet** peut être conservé dans le bloc réfrigéré en tenant compte de la durée maximum de 5 heures.

C. Analyse d'étalonnage

Pour paramétrer l'analyse de calibration pour les Q-PCR Standards, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

- Décongeler un tube de chaque niveau de BCR-ABL P190 Q - PCR Standard pour la calibration de P190 (Cal1 : BCR-ABL Q-PCR Standards 10¹, Cal2 : BCR-ABL Q-PCR Standards 10², Cal3 : BCR-ABL Q-PCR Standards 10³, Cal4 : BCR-ABL Q-PCR Standards 10⁴, Cal5 : BCR-ABL Q-PCR Standards 10⁵). Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Décongeler un autre tube de BCR-ABL P190 Q - PCR Standard 10⁵, 10⁴ et 10³ pour la calibration d'ABL (Cal3 : BCR-ABL Q-PCR Standards 10³, Cal4 : BCR-ABL Q-PCR Standards 10⁴, Cal5 : BCR-ABL Q-PCR Standards 10⁵). Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
- Même si aucune extraction ne sera effectuée, vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initia) est de 200 µl et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'éluion extrait) est de 100 µl.
- Pour la calibration de P190, sélectionner le protocole de test « BCR-ABL P190 ELITe_STD_P190 » dans la colonne « Assay » (Test) et renseigner le numéro de lot et la date de péremption du **BCR-ABL P190 Q-PCR Standard**.
- Pour la calibration d'ABL, sélectionner le protocole de test « BCR-ABL P190 ELITe_STD_ABL » dans la colonne « Assay » (Test) et renseigner le numéro de lot et la date de péremption du **BCR-ABL P190 Q-PCR Standard**.
- Charger le **mélange réactionnel complet** sur le « Inventory Block » (Bloc inventaire) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR) et les tubes **BCR-ABL P190 Q-PCR Standard** en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système **ELITe InGenius** permet à l'utilisateur de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : au terme de l'analyse, les **BCR-ABL P190 Q-PCR Standard** restants doivent être retirés de l'instrument, bouchés et conservés à -20 °C.

Remarque : au terme de l'analyse, les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR) contenant les produits de réaction et les autres consommables doivent être retirés de l'instrument et mis au rebut en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit

réactifs pour la transcription inverse de l'ARN
et l'amplification en temps réel de l'ADNc

REF RTSG07PLD190

Remarque : au terme de l'analyse, le **mélange réactionnel complet** peut être conservé dans le bloc réfrigéré en tenant compte de la durée maximum de 5 heures.

D. Analyse d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif

Pour paramétrer l'analyse d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif, effectuer les étapes suivantes comme indiqué par la GUI :

- Décongeler le tube BCR-ABL P190 - ELITe Positive Control pour la session d'analyse. Chaque tube permet d'effectuer 2 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
- Transférer au minimum 80 µl d'eau de qualité biologie moléculaire dans un « Elution tube » (Tube d'éluion) inclus dans le « ELITe InGenius SP 200 Consumable Set ».
- Sélectionner « Perform Run » (Exécuter l'analyse) dans l'écran « Home » (Accueil).
- Même si aucune extraction ne sera effectuée, vérifier que le « Extraction Input Volume » (Volume d'extraction initia) est de 200 µl et que le « Extracted Elute Volume » (Volume d'éluion extrait) est de 100 µl.
- Dans la « Track » (Position) d'intérêt, sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Assay » (Test).
- Pour le contrôle positif, sélectionner le protocole de test « BCR-ABL P190 ELITe_PC » dans la colonne « Assay » (Test) et renseigner le numéro de lot et la date de péremption du BCR-ABL P190 Positive Control.
- Pour le contrôle négatif, sélectionner le protocole de test « BCR-ABL P190 ELITe_NC » dans la colonne « Assay » (Test) et renseigner le numéro de lot et la date de péremption de l'eau de qualité biologie moléculaire.
- Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le **mélange réactionnel complet** sur le « Inventory Block » (Bloc inventaire) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Inventory Area » (Zone inventaire) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR), le tube BCR-ABL P190 Positive Control et le tube de contrôle négatif en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Next » (Suivant) pour poursuivre le paramétrage.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Start » (Démarrer) pour lancer l'analyse.

Au terme du processus, le système **ELITe InGenius** permet à l'utilisateur de visualiser, d'approuver et de stocker les résultats, puis d'imprimer et d'enregistrer le rapport.

Remarque : au terme de l'analyse, le **BCR-ABL P190 Positive Control** restant doit être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C. Le contrôle négatif restant doit être mis au rebut.

Remarque : au terme de l'analyse, les « PCR Cassettes » (Cassettes de PCR) contenant les produits de réaction et les autres consommables doivent être retirés de l'instrument et mis au rebut en évitant toute contamination environnementale. Éviter tout déversement des produits de la réaction.

Remarque : au terme de l'analyse, le **mélange réactionnel complet** peut être conservé dans le bloc réfrigéré en tenant compte de la durée maximum de 5 heures.

Examen et approbation des résultats

Au terme de l'analyse, l'écran « Results Display » (Affichage des résultats) s'affiche automatiquement. Dans cet écran, les résultats de l'échantillon/du calibrateur/des contrôles et les informations concernant l'analyse sont affichés. À partir de cet écran, il est possible d'approuver le résultat, d'imprimer ou d'enregistrer les rapports [« Sample Report » (Rapport échantillons) ou « Track Report » (Rapport des positions)]. Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

Remarque : le système **ELITe InGenius** peut être connecté au « Serveur de gestion des informations de laboratoire » (LIS) qui permet d'envoyer les résultats de la session de travail au centre de données du laboratoire. Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

Le système **ELITe InGenius** génère les résultats à l'aide du produit **BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit** en exécutant la procédure suivante :

- A. Validation de la courbe d'étalonnage,
- B. Validation des résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification,
- C. Validation des résultats de l'échantillon,
- D. Rapport des résultats de l'échantillon.

A. Validation de la courbe d'étalonnage

Les signaux de fluorescence émis par la sonde pour P190 (Canal 1 « P190 ») dans les réactions d'amplification du calibrateur sont analysés automatiquement et interprétés par le logiciel de l'instrument avec les paramètres inclus dans le protocole de test « BCR-ABL ELITe_STD_P190 ».

Les signaux de fluorescence émis par la sonde pour ABL (Canal 1 « ABL ») dans les réactions d'amplification du calibrateur sont analysés automatiquement et interprétés par le logiciel de l'instrument avec les paramètres inclus dans le protocole de test « BCR-ABL ELITe_STD_ABL ».

Les courbes d'étalonnage de P190 et ABL, spécifiques au lot de réactifs d'amplification, sont stockées dans la base de données (Calibration) [Calibration]. Elles peuvent être visualisées et approuvées par du personnel qualifié disposant des privilèges « Administrator » (Administrateur) ou « Analyst » (Analyste), en suivant les instructions de la GUI.

Les courbes d'étalonnage, spécifiques au lot de réactifs d'amplification, expirent **au bout de 60 jours**.

Remarque : si la courbe d'étalonnage ne satisfait pas les critères d'acceptation, le message « Failed » (Échec) s'affiche dans l'écran « Calibration » (Calibration) et elle ne peut pas être approuvée. Les réactions d'amplification des calibrateurs doivent être répétées.

Remarque : si la courbe d'étalonnage est analysée avec des échantillons et que son résultat est non valide, l'intégralité de la session d'analyse est non valide. Dans ce cas, l'amplification de tous les échantillons doit être également répétée.

B. Validation des résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification

Les signaux de fluorescence émis par la sonde pour P190 (Canal 1 « P190 ») dans la réaction d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif sont analysés automatiquement et interprétés par le logiciel de l'instrument avec les paramètres inclus dans les protocoles de test « BCR-ABL P190 ELITe_PC » et « BCR-ABL P190 ELITe_NC ».

Les résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification, spécifiques au lot de réactifs d'amplification utilisé, sont enregistrés dans la base de données (Controls [Contrôles]). Ils peuvent être visualisés et approuvés par du personnel qualifié disposant des privilèges « Administrator » (Administrateur) ou « Analyst » (Analyste), en suivant les instructions de la GUI.

Les résultats du contrôle positif et du contrôle négatif d'amplification, spécifiques au lot de réactifs d'amplification, expirent **au bout de 15 jours**.

Les résultats de l'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif sont utilisés par le logiciel de l'instrument pour paramétrer les « Control Charts » (Graphiques de contrôle). Quatre résultats de contrôle positif et de contrôle négatif, provenant de 4 analyses différentes, sont requis pour configurer le « Control Chart » (Graphique de contrôle). Ensuite, les résultats du contrôle positif et du contrôle négatif sont utilisés pour surveiller les performances de l'étape d'amplification. Se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument pour plus de détails.

Remarque : si les résultats du contrôle positif ou du contrôle négatif d'amplification ne satisfont pas les critères d'acceptation, le message « Failed » (Échec) s'affiche dans l'écran « Controls » (Contrôles) et il ne peuvent pas être approuvés. Dans ce cas, la réaction du contrôle positif ou du contrôle négatif d'amplification doit être répétée.

Remarque : si le contrôle positif ou le contrôle négatif est analysé avec des échantillons à tester et que son résultat est non valide, l'intégralité de la session d'analyse est non valide. Dans ce cas, l'amplification de tous les échantillons doit être également répétée.

C. Validation des résultats des échantillons

Les signaux de fluorescence émis par la sonde pour P190 (Canal 1 « P190 ») et par la sonde pour ABL (Canal 1 « ABL ») dans les réactions d'amplification de l'échantillon sont analysés automatiquement et interprétés par le logiciel de l'instrument avec les paramètres inclus dans le protocole de test BCR-ABL P190_PBL_200_100.

Les résultats sont présentés dans les rapports générés par l'instrument (« Results Display » [Affichage des résultats]).

L'analyse de l'échantillon peut être approuvée lorsque les trois conditions indiquées dans le tableau ci-dessous sont satisfaites.

1) Courbe d'étalonnage	Statut
BCR-ABL P190 Q-PCR Standard	APPROUVÉ
2) Contrôle positif	Statut
BCR-ABL P190 Positive Control	APPROUVÉ
3) Contrôle négatif	Statut
BCR-ABL P190 Negative Control	APPROUVÉ

Pour chaque échantillon, le résultat du test est automatiquement interprété par le système selon l'algorithme du logiciel **ELITe InGenius** et les paramètres du protocole de test, et tel que décrit au paragraphe suivant.

Dans le cas des réactions d'amplification de chaque **échantillon**, les valeurs **P190 Ct** (Ct P190) sont utilisées pour détecter et quantifier la présence de l'ARNm cible, tandis que les valeurs **ABL Ct** (Ct ABL) sont utilisées pour détecter et quantifier la présence de l'ARNm de contrôle (validation de l'extraction et normalisation de la cible).

Les valeurs **P190 Ct** (Ct P190) et **ABL Ct** (Ct ABL) dans les réactions d'amplification de chaque **échantillon** et les **courbes d'étalonnage** sont utilisées pour calculer la quantité **d'ARNm** de P190 et d'ABL présente dans les réactions d'amplification des échantillons. Les **quantités d'ARNm** de P190 et d'ABL sont ensuite utilisées pour calculer le **pourcentage de copies d'ARNm de P190** normalisées en fonction du nombre de copies d'ARNm d'ABL (**% P190**).

Les messages des résultats possibles d'un échantillon sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Résultat de l'analyse de l'échantillon	Interprétation
P190: le pourcentage est x,xxxx % (P190:percentage is x.xxxx%)	L'ARN de P190 a été détecté. La valeur % P190 calculée s'affiche.
P190: le pourcentage est 0,0000% (P190:percentage is 0.0000%)	L'ARN de P190 n'a pas été détecté ou est inférieur à la limite de détection du test. Équivalent à % P190 = 0 %.
Non concluant - Tester à nouveau l'échantillon (Inconclusive - Retest Sample)	L'ARN de P190 a été détecté mais le % P190 ne peut pas être calculé. Les différences entre les quantités de P190 dans l'échantillon en double ne sont pas acceptables. Tester à nouveau l'échantillon.
Non valide - Tester à nouveau l'échantillon (Invalid - Retest Sample)	L'ARN d'ABL est inférieur à la valeur seuil (10 000 copies). Tester à nouveau l'échantillon.

Pour compléter les informations de chaque échantillon analysé, les résultats des réactions individuelles (Tracks [Positions]) pour les cibles P190 et ABL sont rapportés de la manière suivante.

Résultat d'un seul réplicat	Interprétation
P190 : ARN détecté, quantité égale à xxx copies/réaction (P190: RNA Detected, quantity equal to xxx copies/reaction)	L'ARN de P190 a été détecté. La quantité calculée d'ARNm de P190 s'affiche.
P190 : ARN non détecté ou inférieur à la LoD (P190: RNA Not detected or below the LoD)	L'ARN de P190 n'a pas été détecté ou est inférieur à la limite de détection du test.
ABL : ARN détecté, quantité égale à xxx copies/réaction (ABL: RNA Detected, quantity equal to xxx copies/reaction)	L'ARN d'ABL a été détecté. La quantité calculée d'ARNm d'ABL s'affiche.
ABL : ARN non détecté ou inférieur à la LoD (ABL: RNA Not detected or below the LoD)	L'ARN d'ABL n'a pas été détecté ou est inférieur à la limite de détection du test.

Le tableau suivant présente les différents cas qui peuvent se produire lors d'une session d'amplification, ainsi que l'approche pour générer les messages de résultat.

Échantillon	P190 (copies/réaction)	ABL (copies/réaction)	Résultat de l'analyse de l'échantillon (% P190)	Interprétation
1 ^{er} réplicat	Quantité	Quantité ≥ 10 000	Le pourcentage de P190 est x,xxxx % (P190 percentage is x.xxxx%)	L'ARN de P190 a été détecté. La valeur % P190 calculée s'affiche.
2 ^e réplicat	Quantité	Quantité ≥ 10 000		
1 ^{er} réplicat	Non détecté	Quantité ≥ 10 000	ARN de P190 non détecté ou inférieur à la LoD (P190 RNA Not Detected or below the LoD)	L'ARN de P190 n'a pas été détecté ou est inférieur à la limite de détection du test. Équivalent à % P190 = 0 %
2 ^e réplicat	Non détecté	Quantité ≥ 10 000		
1 ^{er} réplicat	Quantité < 10 copies	Quantité ≥ 10 000	Le pourcentage de P190 est x,xxxx % (P190 percentage is x.xxxx%)	L'ARN de P190 a été détecté. La valeur % P190 calculée s'affiche.
2 ^e réplicat	Non détecté	Quantité ≥ 10 000		
1 ^{er} réplicat	Quantité > 10 copies	Quantité ≥ 10 000		L'ARN de P190 a été détecté mais le % P190 ne peut pas être calculé. Les différences entre les quantités de P190 dans l'échantillon en double ne sont pas acceptables. Tester à nouveau l'échantillon.
2 ^e réplicat	Non détecté	Quantité ≥ 10 000	Non concluant - Tester à nouveau l'échantillon (Inconclusive - Retest Sample)	
1 ^{er} réplicat	Détecté ou Non détecté	Quantité < 10 000	Non valide - Tester à nouveau l'échantillon (Invalid-Retest Sample)	L'ARN d'ABL est inférieur à la valeur seuil (10 000 copies). Tester à nouveau l'échantillon.
2 ^e réplicat	Détecté ou Non détecté	Quantité ≥ 10 000		
1 ^{er} réplicat	DÉTECTÉ ou NON DÉTECTÉ	Quantité < 10 000	Non valide - Tester à nouveau l'échantillon (Invalid-Retest Sample)	L'ARN d'ABL est inférieur à la valeur seuil (10 000 copies). Tester à nouveau l'échantillon.
2 ^e réplicat	DÉTECTÉ ou NON DÉTECTÉ	Quantité < 10 000		

Remarque : si le résultat de la réaction d'amplification de P190 est < 3 copies/réaction pour un échantillon, la quantité rapportée sera de 3 copies/réaction.

Les échantillons rapportés comme « Non valide - Tester à nouveau l'échantillon » (Invalid - Retest Sample) par le logiciel ELITe InGenius ne sont pas appropriés pour l'interprétation des résultats car l'ARNm d'ABL n'a pas été efficacement détecté. Dans ce cas, des problèmes sont survenus pendant la phase d'extraction (perte d'ARN, présence d'inhibiteurs ou dégradation de l'ARN extrait – se reporter à la section « Problèmes et solutions ») pouvant entraîner des résultats incorrects et des faux négatifs. L'échantillon n'est pas adapté pour le calcul du % P190, le test est non valide et doit être répété sur l'ARN extrait en premier et, si un problème est confirmé, répété à partir de l'extraction d'un nouvel échantillon.

Les échantillons rapportés comme « Non concluant - Tester à nouveau l'échantillon » (Inconclusive - Retest Sample) par le logiciel ELITe InGenius ne sont pas appropriés pour l'interprétation des résultats car l'ARNm de P190 n'a pas été efficacement détecté. Dans ce cas, des problèmes sont survenus pendant la phase d'extraction (perte d'ARN, présence d'inhibiteurs ou dégradation de l'ARN extrait – se reporter à la section « Problèmes et solutions ») pouvant entraîner des résultats incorrects et des faux négatifs. L'échantillon n'est pas adapté pour le calcul du % P190, le test est non concluant et doit être répété sur l'ARN extrait en premier et, si un problème est confirmé, répété à partir de l'extraction d'un nouvel échantillon.

Les échantillons rapportés comme « ARN de P190 non détecté ou inférieur la LoD » (P190 RNA Not Detected or below LoD) sont appropriés pour l'analyse mais il n'a pas été possible de détecter l'ARN de P190. Dans ce cas, il n'est pas possible d'exclure le fait que de l'ARN soit présent à une concentration inférieure à la limite de détection du test (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »).

Remarque : les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en tenant compte de l'ensemble des données cliniques et des autres résultats d'analyse de laboratoire du patient.

Les résultats de l'analyse des échantillons sont stockés dans la base de données et, s'ils sont valides, peuvent être approuvés (Result Display [Affichage des résultats]) par du personnel qualifié disposant des privilèges « Administrator » (Administrateur) ou « Analyst » (Analyste) en suivant les instructions de la GUI. Dans la fenêtre « Result Display » (Affichage des résultats), il est possible d'imprimer et d'enregistrer les résultats de l'analyse des échantillons sous forme de « Sample Report » (Rapport échantillons) et « Track Report » (Rapport des positions).

D. Rapport des résultats des échantillons

Les résultats de l'échantillon sont stockés dans la base de données et les rapports peuvent être visualisés sous forme de « Sample Report » (Rapport échantillons) et « Track Report » (Rapport des positions).

Le « Sample Report » (Rapport échantillons) présente les détails d'une session de travail triés par échantillon sélectionné (SID).

Le « Track Report » (Rapport des positions) présente les détails d'une session de travail par position sélectionnée.

Les « Sample Report » (Rapport échantillons) et « Track Report » (Rapport des positions) peuvent être imprimés et signés par le personnel agréé.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Limite de détection

La limite de détection de P190 du test avec l'ARN total a été vérifiée en utilisant le matériel de référence étalonné « IVS-0032 Clonal Control RNA » (InVivoScribe, États-Unis), de l'ARN total extrait d'une lignée cellulaire humaine positive pour BCR-ABL P190 e1a2 dilué dans l'ARN total d'une lignée cellulaire humaine négative pour la translocation. La dilution $10^{-4.5}$ a été testée en 40 réplicats (300 ng d'ARN/réaction), en effectuant la réaction de transcription inverse et d'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. en association avec le système ELITe InGenius.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Limite de détection avec des échantillons d'ARN total et le système ELITe InGenius					
Échantillon	Dilution	N	Positif	Négatif	%P190
ARN de P190	$10^{-4.5}$	40	39	1	0,0032 %

Tous les réplicats se sont avérés être positifs pour P190, avec une concentration moyenne de % P190 égale à 0,0032 %. La quantité moyenne d'ABL enregistrée dans les tests pour la définition de la limite de détection était d'environ 120 000 copies par réaction.

Plage de mesure linéaire

La plage de mesure linéaire de P190 de ce test avec l'ARN total a été déterminée en utilisant le panel du matériel de référence étalonné « IVS-0032 Clonal Control RNA » (InVivoScribe, États-Unis). Le panel est constitué d'ARN total extrait d'une lignée cellulaire humaine positive pour BCR-ABL P190 e1a2 dilué dans l'ARN total d'une lignée cellulaire humaine négative pour la translocation. Les dilutions allaient de l'ARN pur positif pour P190 (ARN de P190) à 10^{-5} (étapes de dilution de 1 log). Chaque échantillon du panel a été testé en 4 réplicats (300 ng d'ARN/réaction), en effectuant la réaction de transcription inverse et d'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. en association avec le système ELITe InGenius. L'analyse statistique a été réalisée par une régression linéaire.

L'analyse des données obtenues a démontré que le test présentait une réponse linéaire pour les points de panel allant de l'ARN pur positif pour P190 à une dilution de 10^{-5} avec un coefficient de corrélation linéaire supérieur à 0,99.

La limite supérieure de la mesure linéaire vérifiée dans ce test est l'ARN pur positif pour P190, correspondant à une concentration de %P190 égale à 100 %.

La limite inférieure de la mesure linéaire vérifiée dans ce test est la dilution de 10^{-5} , inférieure à la limite de détection et correspondant à une concentration de % P190 égale à 0,001 %.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Plage de mesure linéaire avec des échantillons d'ARN total et le système ELITe InGenius			
Échantillon	Nombre moyen de copies de P190/réaction	Nombre moyen de copies log. de P190/réaction	Écart-type
ARN de P190	346 796	5,540	0,01
Dilution à $10^{-1.0}$	34 073	4,532	0,02
Dilution à $10^{-2.0}$	3 453	3,530	0,10
Dilution à $10^{-3.0}$	474	2,675	0,034
Dilution à $10^{-4.0}$	74	1,860	0,094
Dilution à $10^{-5.0}$	4	0,590	n.a.

La quantité moyenne d'ABL enregistrée dans les tests était d'environ 180 000 copies par réaction.

Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été testée en analysant un panel d'échantillons cliniques positifs pour P190.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant 24 échantillons de sang périphérique frais prélevé sur EDTA chez des patients leucémiques testés positifs pour la translocation de BCR-ABL, variant P190, par un produit d'amplification en temps réel de DIV portant le marquage CE. Chaque échantillon a été testé avec le système **ELITe InGenius** en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant :

Échantillons	N	positifs	négatifs
Échantillons de sang périphérique positifs pour P190	24	24	0

Dans le test, 24 échantillons sur 24 ont été confirmés. Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était de 100 %.

La quantité moyenne d'ABL enregistrée dans les tests était d'environ 70 000 copies par réaction.

Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons négatifs, a été évaluée en analysant un panel d'échantillons cliniques négatifs pour P190.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 30 échantillons de sang périphérique frais prélevé sur EDTA chez différents sujets testés négatifs pour la translocation de BCR-ABL, variant P190, par un produit d'amplification en temps réel de DIV portant le marquage CE. Chaque échantillon a été testé avec le système **ELITe InGenius** en mode « Extract + PCR » (Extraction + PCR).

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant :

Échantillons	N	positifs	négatifs
Échantillons de sang périphérique négatifs pour P190	30	1	29

Dans le test, 29 échantillons sur 30 ont été confirmés et un échantillon a généré un résultat positif discordant. Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était égale à 96,7 %.

La quantité moyenne d'ABL enregistrée dans les tests était d'environ 50 000 copies par réaction.

Remarque : les données complètes et les résultats des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit avec les matrices et les instruments sont enregistrés dans le fichier technique du produit « BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit », FTP G07PLD190.

Numéro

P190 S1 - P190 S6 : réactions de P190 avec les échantillons à tester,

P190 NC : réaction de P190 avec le contrôle négatif,

P190 101, P190 102, P190 103, P190 104, P190 105 : réactions de P190 avec l'étalon d'ADN à 10¹, 10², 10³, 10⁴ et 10⁵ copies/réaction.

ABL S1 - ABL S6 : réactions d'ABL avec les échantillons à tester,

ABL NC : réactions d'ABL avec le contrôle d'amplification négatif,

ABL 103, ABL 104, ABL 105 : réactions d'ABL avec l'étalon d'ADN à 10³, 10⁴ et 10⁵ copies/réaction.

En se reportant à la documentation de l'instrument, définir les paramètres du **cycle thermique** sur le logiciel dédié (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile [Instrument > Protocole du thermocycleur > Profil thermique]) :

- à l'étape d'amplification, ajouter une étape (Add Step [Ajouter étape]) d'**extension à 72 °C** ;

Remarque : l'acquisition de la fluorescence (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection [Instrument > Protocole du thermocycleur > Paramètres > Collecte de données]) doit être paramétrée pendant l'**étape d'hybridation à 56 °C**.

- modifier le temps comme indiqué dans le tableau « **Cycle thermique** » ;
- paramétrer le nombre de cycles à **45** ;
- paramétrer le volume de la réaction à **30 µl**.

Cycle thermique		
Phase	Température	Temps
Transcription inverse	50 °C	20 min.
Dénaturation initiale	94 °C	5 min.
Amplification et détection (45 cycles)	94 °C	10 s
	56 °C (acquisition de la fluorescence)	30 s
	72 °C	15 s

Avec le **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** :

Avant de commencer la session d'analyse, en se reportant à la documentation de l'instrument, suivre les instructions ci-dessous :

- mettre le thermocycleur en temps réel en marche, puis l'ordinateur de contrôle, lancer le logiciel et ouvrir une session de « absolute quantification » (quantification absolu) et sélectionner « Run mode: Fast 7500 » (Mode d'exécution : Fast 7500) ;
- paramétrer (à l'aide du « Detector Manager » [Gestionnaire de détecteur]) : le « detector » (détecteur) pour la sonde P190 avec le « reporter » (rapporteur) = « FAM » et le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « P190 » ;
- paramétrer (à l'aide du « Detector Manager » [Gestionnaire de détecteur]) : le « detector » (détecteur) pour la sonde ABL avec le « reporter » (rapporteur) = « FAM » et le « quencher » (désactivateur) = « none » (aucun) (non fluorescent) et le nommer « ABL » ;
- pour chaque puits utilisé dans la microplaque, paramétrer (à l'aide du Well Inspector [Inspecteur de puits]) : le « detector » (détecteur) (type de fluorescence à mesurer), la « passive reference » (référence passive) = « CY5 » (AP593 est utilisé à la place de CY5, pour la normalisation de la fluorescence mesurée) et le type de réaction (échantillon, contrôle d'amplification négatif, contrôle d'amplification positif ou étalon en quantité connue). Ajouter ces informations à la **Work Sheet** (Fiche de travail) jointe à la fin du présent manuel ou imprimer la configuration de la microplaque. La **Work Sheet** (Fiche de travail) doit être scrupuleusement suivie pendant le transfert du mélange réactionnel complet et des échantillons dans les puits.

Remarque : afin de déterminer le titre en ARN de l'échantillon de départ, préparer en double les réactions à l'aide du produit **Q - PCR standard** pour obtenir les deux **courbes d'étalonnage** – l'une pour P190 (10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ copies/réaction) et l'autre pour ABL (10⁵, 10⁴, 10³ copies/réaction).

Remarque : Pour optimiser l'utilisation du produit, la courbe d'étalonnage pour P190 peut être paramétrée en omettant le niveau de Q - PCR Standard à 10¹ copies/réaction et en utilisant les 4 autres niveaux de Q - PCR Standard (10⁵, 10⁴, 10³, 10² copies/réaction) ou en utilisant le niveau de Q - PCR Standard à 10¹

copies/réaction et en omettant le niveau de Q - PCR Standard à 10³ copies/réaction (10⁵, 10⁴, 10², 10¹ copies/réaction).

Remarque : calculer, pour la cible P190 et le contrôle ABL, deux puits pour chaque échantillon à analyser (S), deux puits pour l'amplification du contrôle négatif (NC) et deux puits pour chaque étalon « Q-PCR Standard » (5 ou 4 points pour P190 et 3 points pour ABL).

La configuration de l'analyse quantitative de 6 échantillons est présentée, à titre d'exemple, dans le paragraphe précédent décrivant la procédure pour l'instrument **7300 Real Time PCR System**.

En se reportant à la documentation de l'instrument, définir les paramètres du **cycle thermique** sur le logiciel dédié (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile [Instrument > Protocole du thermocycleur > Profil thermique]) :

- à l'étape d'amplification, ajouter une étape (Add Step [Ajouter étape]) d'**extension à 72 °C** ;

Remarque : l'acquisition de la fluorescence (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection [Instrument > Protocole du thermocycleur > Paramètres > Collecte de données]) doit être paramétrée pendant l'**étape d'hybridation à 56 °C**.

- modifier le temps comme indiqué dans le tableau « **Cycle thermique** » ;
- paramétrer le nombre de cycles à **45** ;
- paramétrer le volume de la réaction à **30 µl**.

Cycle thermique		
Phase	Température	Temps
Transcription inverse	50 °C	20 min.
Dénaturation initiale	94 °C	5 min.
Amplification et détection (45 cycles)	94 °C	10 s
	56 °C (acquisition de la fluorescence)	30 s
	72 °C	15 s

Paramétrage de l'amplification

(À effectuer dans la zone dédiée à l'extraction/la préparation)

Avant de commencer la session d'analyse, suivre les instructions ci-dessous :

- vérifier la disponibilité des réactifs requis pour chaque échantillon à analyser (voir le tableau page 10).
- sortir et décongeler à température ambiante (+18/25 °C) les tubes à essai contenant les échantillons d'ARN à analyser. Agiter les tubes au vortex pendant 5 secondes, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes dans un bloc réfrigéré ;
- sortir et décongeler à température ambiante (+18/25 °C) pendant 30 minutes les tubes à essai des mélanges **P190 PreMix** (capuchon VIOLET) et **ABL PreMix** (capuchon NEUTRE) nécessaires pour la session d'analyse. Se rappeler que le contenu de chaque tube à essai est suffisant pour effectuer **50 réactions**. Agiter les tubes au vortex à trois reprises pendant 10 secondes, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes dans un bloc réfrigéré ;
- sortir et décongeler à température ambiante (+18/25 °C) pendant 30 minutes les tubes à essai contenant le mélange **PCR MasterMix** (capuchon NEUTRE) nécessaires pour la session d'analyse. Se rappeler que le contenu de chaque tube à essai est suffisant pour effectuer jusqu'à **50 réactions**. Agiter les tubes au vortex à trois reprises pendant 10 secondes, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes dans un bloc réfrigéré ;
- sortir les tubes de **RT EnzymeMix** (capuchon NOIR) nécessaires pour la session d'analyse, en se rappelant que le contenu de chaque tube est suffisant pour effectuer **50 réactions**. Centrifuger pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond et conserver dans un bloc réfrigéré ;

Remarque : le mélange **RT EnzymeMix** ne doit pas être exposé à des températures supérieures à -20 °C pendant plus de 10 minutes.

- sortir et décongeler à température ambiante (+18/25 °C) pendant 30 minutes les tubes de **P190-ABL Q-PCR Standard** nécessaires pour la session d'analyse (**pour les deux réactions P190 et ABL**). Se rappeler que le contenu de chaque tube à essai est suffisant pour effectuer **12 réactions**. Agiter les tubes au vortex à trois reprises pendant 10 secondes, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes dans un bloc réfrigéré ;

- se munir de la **microplaque d'amplification** qui sera utilisée pendant la session d'analyse, en veillant à la manipuler avec des gants non poudrés et à ne pas endommager les puits,
- se munir de la **feuille de scellage d'amplification** qui sera utilisée pendant la session d'analyse, en veillant à la manipuler avec des gants non poudrés et à ne pas l'endommager,
- préparer deux tubes en polypropylène stériles de 1,5 ml (non fournis avec ce produit) : l'un pour le mélange réactionnel complet de **P190**, l'autre pour le mélange réactionnel complet de **ABL**, et les marquer de manière reconnaissable avec un marqueur permanent ;
- préparer deux mélanges réactionnels complets, l'un pour **P190**, l'autre pour **ABL**, en utilisant les trois composants fournis dans le produit, en fonction du nombre d'échantillons à analyser, comme décrit dans le tableau suivant.

Remarque : pour préparer une réaction de transcription inverse et d'amplification en temps réel, 5 µl de PreMix, 15 µl de PCR MasterMix et 0,3 µl de RT EnzymeMix sont nécessaires. Les volumes indiqués dans le tableau sont suffisants pour configurer les réactions de transcription inverse et d'amplification en temps réel requises pour le nombre d'échantillons à tester, le contrôle négatif et quatre Q-PCR Standards, en double et avec une marge de sécurité adéquate.

Nombre d'échantillons	PreMix	PCR MasterMix	RT EnzymeMix
1	65 µl	195 µl	3,9 µl
2	75 µl	225 µl	4,5 µl
3	85 µl	255 µl	5,1 µl
4	95 µl	285 µl	5,7 µl
5	110 µl	330 µl	6,6 µl
6	120 µl	360 µl	7,2 µl
7	130 µl	390 µl	7,8 µl
8	140 µl	420 µl	8,4 µl
9	150 µl	450 µl	9,0 µl
10	160 µl	480 µl	9,6 µl
11	170 µl	510 µl	10,2 µl
12	180 µl	540 µl	10,8 µl
13	190 µl	570 µl	11,4 µl
14	205 µl	615 µl	12,3 µl
15	215 µl	645 µl	12,9 µl
16	225 µl	675 µl	13,5 µl
17	235 µl	705 µl	14,1 µl
18	245 µl	735 µl	14,7 µl
19	255 µl	765 µl	15,3 µl

Agiter les deux mélanges réactionnels complets au vortex à trois reprises pendant 10 secondes, centrifuger le contenu pendant 5 secondes et conserver les tubes dans un bloc réfrigéré.

Remarque : les mélanges réactionnels complets préparés doivent être utilisés dans un délai d'une (1) heure maximum. Les mélanges réactionnels préparés ne **peuvent pas** être stockés.

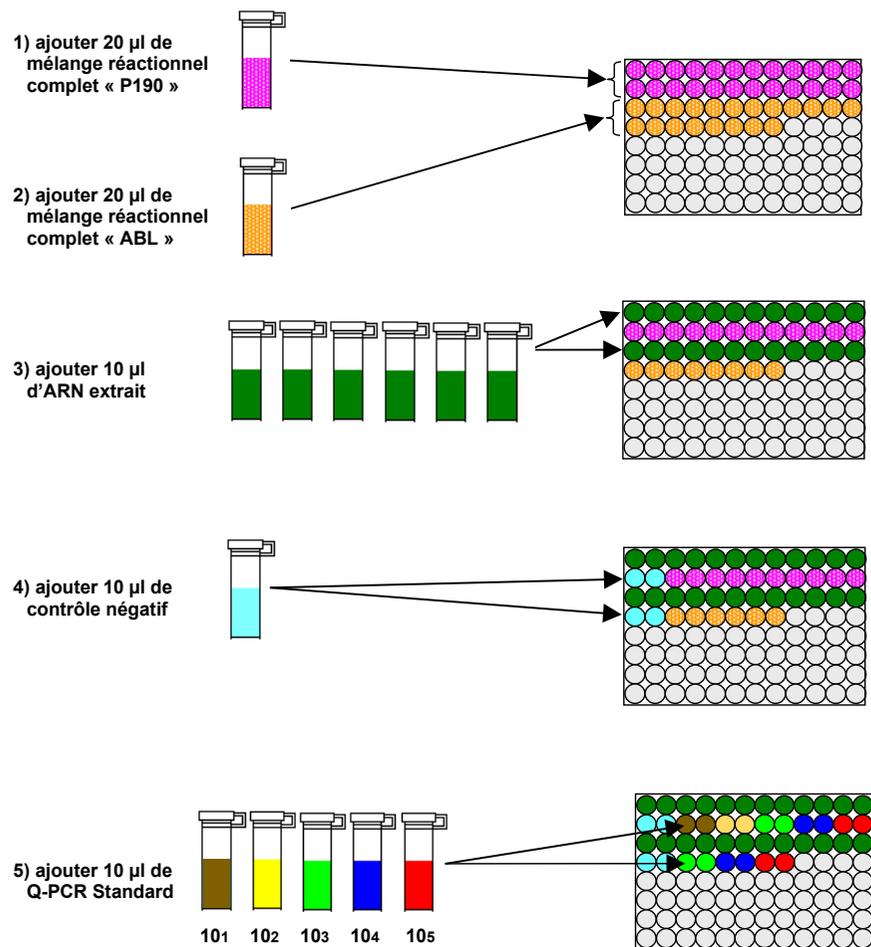
Configurer les **réactions de P190 et ABL** comme décrit ci-dessous en veillant à maintenir la **microplaque d'amplification** dans un bloc réfrigéré (environ +5 °C).

1. Pipeter avec précision **20 µl** de **mélange réactionnel complet « P190 »** dans le fond des puits de la **microplaque d'amplification de « P190 »**, comme indiqué précédemment dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Éviter d'introduire des bulles.
2. Pipeter avec précision **20 µl** de **mélange réactionnel complet « ABL »** dans le fond des puits de la **microplaque d'amplification de « ABL »**, comme indiqué précédemment dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Éviter d'introduire des bulles.
3. Pipeter avec précision **10 µl d'ARN extrait** dans le mélange réactionnel complet du premier échantillon dans les deux puits correspondants de **« P190 »** et dans les deux puits correspondants de **« ABL »** de la **microplaque d'amplification**, comme indiqué précédemment dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger l'échantillon en pipetant à trois reprises l'**ARN extrait** dans le mélange réactionnel complet. Éviter de créer des bulles à la fois au fond du puits et en surface. Procéder de la même manière avec tous les autres échantillons d'**ARN extrait**.

4. Pipeter avec précision **10 µl d'eau de qualité biologie moléculaire** (non fournie avec ce produit) dans le mélange réactionnel complet dans les deux puits correspondants de **« P190 »** et dans les deux puits correspondants de **« ABL »** de la **microplaque d'amplification**, comme indiqué précédemment dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger le contrôle négatif en pipetant à trois reprises l'**eau de qualité biologie moléculaire** dans le mélange réactionnel complet. Éviter de créer des bulles à la fois au fond du puits et en surface.
5. Pipeter avec précision **10 µl** du premier **P190-ABL Q-PCR Standard** dans le mélange réactionnel complet dans les deux puits correspondants de **« P190 »** de la **microplaque d'amplification**, comme indiqué précédemment dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger l'étalon en pipetant à trois reprises le **P190-ABL Q-PCR Standard** dans le mélange réactionnel complet. Éviter de créer des bulles à la fois au fond du puits et en surface. Procéder de la même manière avec les autres étalons **P190-ABL Q-PCR Standards**.
6. Pipeter avec précision **10 µl** du premier **P190-ABL Q-PCR Standard** dans le mélange réactionnel complet dans les deux puits correspondants de **« ABL »** de la **microplaque d'amplification**, comme indiqué précédemment dans la **Work Sheet** (Fiche de travail). Bien mélanger l'étalon en pipetant à trois reprises le **P190-ABL Q-PCR Standard** dans le mélange réactionnel complet. Éviter de créer des bulles à la fois au fond du puits et en surface. Procéder de la même manière avec les autres étalons **P190-ABL Q-PCR Standards**.
7. Sceller avec précision la **microplaque d'amplification** à l'aide de la **feuille de scellage d'amplification**.
8. Transférer la **microplaque d'amplification** dans le thermocycleur en temps réel dans la zone d'amplification/de détection, et lancer le cycle thermique d'amplification en enregistrant le réglage de la session d'analyse avec un nom de fichier univoque et reconnaissable (p. ex., « année-mois-jour-BCR-ABL-P190- EGSpA »).

Remarque : à la fin du cycle thermique, la **microplaque d'amplification** contenant les produits de la réaction doit être retirée de l'instrument et mise au rebut en évitant toute contamination environnementale. Afin d'éviter de renverser les produits de la réaction, la **feuille de scellage d'amplification ne doit pas être retirée de la microplaque d'amplification**.

La figure suivante présente le paramétrage des réactions d'amplification en temps réel et de la transcription inverse pour P190 et ABL.



Analyse des résultats

Les valeurs de fluorescence émises par la sonde spécifique à P190 (détecteur FAM « P190 ») dans la réaction d'amplification de P190 et par la sonde spécifique à ABL (détecteur FAM « ABL ») dans la réaction d'amplification d'ABL doivent être analysées par le logiciel de l'instrument.

Avant l'analyse, en se reportant à la documentation de l'instrument, il est nécessaire de procéder comme suit :

- paramétrer manuellement (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle [Résultats > Tracé d'amplification > delta Rn vs Cycle]) la plage de calcul pour le **niveau de bruit de fond de la fluorescence (Baseline [Référence])** du cycle 6 au cycle 15.

Remarque : dans le cas d'un échantillon positif présentant un titre élevé de P190 ou d'ABL, la fluorescence FAM de la sonde spécifique pour P190 ou ABL peut commencer à augmenter avant le 15^e cycle. Dans ce cas, la plage de calcul pour la « baseline » (référence) doit être définie pour les deux détecteurs du cycle 6 au cycle dans lequel la fluorescence FAM commence à augmenter, tel que détecté par le logiciel de l'instrument (Results > Component [Résultats > Composant]).

- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) pour le détecteur FAM « P190 » sur **0,1** ;
- paramétrer manuellement le **Threshold** (Seuil) pour le détecteur FAM « ABL » sur **0,1**.

Les valeurs de fluorescence émises par les sondes spécifiques dans les réactions d'amplification et la valeur **Threshold** (Seuil) de fluorescence sont utilisées pour déterminer le **Threshold Cycle (Ct)** (Cycle seuil [Ct]), le cycle auquel le signal de fluorescence atteint la valeur seuil.

Courbe d'étalonnage

Dans le cas de la réaction d'amplification des **Q - PCR Standards** pour P190 et ABL, les valeurs **Ct de P190 et ABL** sont utilisées pour calculer les deux **courbes d'étalonnage** (Results > Standard Curve [Résultats > Courbe d'étalonnage]) de la session d'amplification et pour valider l'amplification et la détection comme indiqué dans le tableau suivant :

Réaction P190 - Q - PCR Standard 10s détecteur FAM « P190 »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct ≤ 25	POSITIF	CORRECTE
Réaction P190 - Courbe d'étalonnage détecteur FAM « P190 »	Plage d'acceptation*	Amplification/Détection
Coefficient de détermination (R2)	0,980 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRECTE
Réaction ABL - PCR Standard 10s détecteur FAM « ABL »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct ≤ 25	POSITIF	CORRECTE
Réaction ABL - Courbe d'étalonnage détecteur FAM « ABL »	Plage d'acceptation	Amplification/Détection
Coefficient de détermination (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRECTE

***Remarque :** Si la courbe d'étalonnage pour P190 a été paramétrée en omettant le niveau de Q - PCR Standard à 10¹ copies/réaction, la plage d'acceptation du coefficient de détermination sera 0,990 ≤ R2 ≤ 1,000.

Si le résultat de la réaction d'amplification du **Q - PCR Standard 10⁵** est **Ct > 25** ou **Ct indéterminé** ou si la valeur du **coefficient de détermination (R2)** ne se situe pas dans les limites, l'ADN cible n'a pas été correctement détecté. Cela signifie que des problèmes sont apparus pendant l'amplification ou la détection (préparation incorrecte du mélange réactionnel complet, distribution incorrecte du mélange réactionnel complet ou des étalons, dégradation de la sonde ou des étalons, réglage incorrect de la position des étalons, réglage incorrect du cycle thermique ; se reporter à la section « Problèmes et solutions »), ce qui peut entraîner des résultats incorrects. La session d'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

Contrôle négatif

Dans le cas de la réaction d'amplification du **contrôle négatif** pour P190 et ABL, les valeurs **Ct** de **P190** et **ABL** (Results > Report [Résultats > Rapport]) sont utilisées pour valider l'amplification et la détection, comme indiqué dans le tableau suivant :

Réaction P190 - Contrôle négatif détecteur FAM « P190 »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct Indéterminé	NÉGATIF	CORRECTE

Réaction ABL - Contrôle négatif détecteur FAM « ABL »	Résultat du test	Amplification/Détection
Ct Indéterminé	NÉGATIF	CORRECTE

Si le résultat de la réaction d'amplification du **contrôle négatif** est différent de **Ct indéterminé** pour P190 et ABL, cela signifie que l'ADN cible a été détecté dans la réaction d'amplification. Des problèmes sont survenus pendant la phase d'amplification (contamination, préparation incorrecte du mélange réactionnel complet, dégradation de la sonde, paramétrage incorrect de la position du contrôle négatif, paramétrage incorrect du cycle thermique ; se reporter à la section « Problèmes et solutions »), ce qui peut entraîner des résultats incorrects et des faux positifs. La session d'analyse n'est pas valide et doit être répétée en commençant par la phase d'amplification.

Échantillons

En cas de réactions d'amplification de chaque **échantillon**, les valeurs **Ct** de **P190** sont utilisées pour détecter et quantifier la présence de l'ARNm cible, tandis que les valeurs **Ct** d'**ABL** sont utilisées pour détecter et quantifier la présence de l'ARNm de contrôle (validation de l'extraction et normalisation de la cible).

Remarque : vérifier, à l'aide des outils logiciels des instruments (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle [Résultats > Tracé d'amplification > delta Rn vs Cycle]), que le **Ct** est déterminé par une augmentation rapide et régulière des valeurs de fluorescence et non par des pics isolés ou une augmentation du signal du bruit de fond.

Les valeurs **P190 Ct** (Ct P190) et **ABL Ct** (Ct ABL) dans les réactions d'amplification de chaque **échantillon** et les **courbes d'étalonnage** de la session d'amplification sont utilisées pour calculer la **quantité d'ARNm** de P190 et ABL présente dans les réactions d'amplification des échantillons.

Réactions d'échantillons		
Détecteur FAM	ARNm	Quantité d'ARNm obtenue
Ct déterminé	DÉTECTÉ	Quantité
Ct Indéterminé	NON DÉTECTÉ	0

Les **quantités** des réactions d'amplification de **P190** et **ABL** pour les doubles de chaque échantillon (Résultats [Results] > Rapport [Report]) sont analysées comme décrit dans le tableau suivant, qui présente les différents cas pouvant se produire lors d'une session d'amplification, ainsi que l'approche d'évaluation des données recommandée :

Échantillon	ARNm de P190	ARNm d'ABL*	Quantité calculée d'ARNm de P190	Quantité calculée d'ARNm d'ABL
1 ^{er} réplicat	DÉTECTÉ	Quantité ≥ 10 000	Quantité totale	Quantité totale
2 ^e réplicat	DÉTECTÉ	Quantité ≥ 10 000		
1 ^{er} réplicat	NON DÉTECTÉ	Quantité ≥ 10 000	0	Quantité totale
2 ^e réplicat	NON DÉTECTÉ	Quantité ≥ 10 000		
1 ^{er} réplicat	Quantité < 10 copies	Quantité ≥ 10 000	Quantité	Quantité totale
2 ^e réplicat	NON DÉTECTÉ	Quantité ≥ 10 000		
1 ^{er} réplicat	Quantité > 10 copies	Quantité ≥ 10 000	Retester l'échantillon	
2 ^e réplicat	NON DÉTECTÉ	Quantité ≥ 10 000		
1 ^{er} réplicat	DÉTECTÉ ou NON DÉTECTÉ	Quantité < 10 000	Retester l'échantillon	
2 ^e réplicat	DÉTECTÉ ou NON DÉTECTÉ	Quantité ≥ 10 000		
1 ^{er} réplicat	DÉTECTÉ ou NON DÉTECTÉ	Quantité < 10 000	Retester l'échantillon	
2 ^e réplicat	DÉTECTÉ ou NON DÉTECTÉ	Quantité < 10 000		

* **Remarque** : si le résultat des réactions d'amplification d'**ABL** d'un échantillon est **ABL Quantity < 10,000** (Quantité ABL < 10 000) ou **ABL NOT DETECTED** (ABL NON DÉTECTÉ), cela signifie que l'ARNm d'ABL n'a pas été détecté efficacement. Dans ce cas, des problèmes sont survenus pendant la phase d'extraction (perte d'ARN, présence d'inhibiteurs ou dégradation de l'ARN extrait – se reporter à la section « Problèmes et solutions ») pouvant entraîner des résultats incorrects et des faux négatifs.

Remarque : si le résultat des réactions d'amplification d'un échantillon est **P190 NOT DETECTED** (P190 NON DÉTECTÉ) et **ABL Quantity < 10,000** (Quantité d'ABL < 10 000) ou **ABL NOT DETECTED** (ABL NON DÉTECTÉ) pour au moins un des deux réplicats, le résultat du test est non valide et l'échantillon n'est pas adapté. Le test doit être répété sur l'ARN extrait en premier et, si le problème est confirmé, répété à partir de l'extraction d'un nouvel échantillon.

Remarque : si le résultat des réactions d'amplification d'un échantillon est **P190 DETECTED** (P190 DÉTECTÉ) et **ABL Quantity < 10,000** (Quantité d'ABL < 10 000) ou **ABL NOT DETECTED** (ABL NON DÉTECTÉ) pour au moins un des deux réplicats, le résultat du test est valide et l'échantillon est positif pour l'ARNm de P190. Dans ce cas, cependant, il n'est pas possible d'effectuer l'analyse quantitative. Le test doit être répété sur l'ARN extrait en premier et, si le problème est confirmé, répété à partir de l'extraction d'un nouvel échantillon.

Remarque : si le résultat de la réaction d'amplification d'un échantillon est **P190 NOT DETECTED** (P190 NON DÉTECTÉ) et **ABL Quantity ≥ 10,000** (Quantité d'ABL ≥ 10 000) pour les deux réplicats, cela signifie que l'ARNm de P190 n'a pas été détecté dans l'ARN obtenu à partir de l'échantillon, mais qu'il n'est pas possible d'exclure la présence d'ARNm de P190 à un titre inférieur à la limite de détection du produit (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »). Dans ce cas, le résultat serait un faux négatif.

Remarque : si le résultat de la réaction d'amplification d'un échantillon est **P190 Quantity > 10 copies** (Quantité de P190 > 10 copies) pour un réplicat et **P190 NOT DETECTED** (P190 NON DÉTECTÉ) pour l'autre réplicat et **ABL Quantity ≥ 10,000** (Quantité d'ABL ≥ 10 000) pour les deux réplicats, l'ARNm de P190 n'a pas été correctement détecté dans l'ARN obtenu à partir de l'échantillon. Le résultat du test est valide et l'échantillon est positif pour l'ARNm de P190. Dans ce cas, cependant, il n'est pas possible d'effectuer l'analyse quantitative. Le test doit être répété sur l'ARN extrait en premier et, si le problème est confirmé, répété à partir de l'extraction d'un nouvel échantillon.

Lorsque le résultat de la réaction d'amplification d'un échantillon est **P190 DETECTED** (P190 DÉTÉCTÉ) et **ABL Quantity ≥ 10,000** (Quantité d'ABL ≥ 10 000), le résultat du test est valide, l'échantillon est positif pour l'ARNm de P190, et il est possible d'effectuer l'analyse quantitative.

Les **quantités calculées d'ARNm de P190 et d'ABL** de chaque échantillon sont utilisées pour calculer le pourcentage de copies d'ARNm de P190 normalisées en fonction du nombre de copies d'ARNm d'ABL (**P190 %**) (% P190) dans l'échantillon de départ selon la formule suivante :

$$\% \text{ P190} = \frac{\text{Quantité calculée d'ARNm de P190}}{\text{Quantité calculée d'ARNm d'ABL}} \times 100$$

Les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en tenant compte de toutes les données cliniques et des autres tests de laboratoire du patient.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Limite de détection

La limite de détection du test pour P190 avec de l'ARN total a été déterminée en utilisant un panel de dilutions préparées à partir du matériel de référence étalonné « IVS-0032 Clonal Control RNA » (InVivoScribe, États-Unis). Le panel est constitué d'ARN total extrait d'une lignée cellulaire humaine positive pour BCR-ABL P190 e1a2 dilué dans de l'ARN total d'une lignée cellulaire humaine négative pour la translocation. Les dilutions utilisées variaient de 10^{-3.5} à 10^{-6.0} (étapes de dilution de 0,5 log). Chaque échantillon du panel a été testé en 24 répliquats (300 ng d'ARN/réaction), en effectuant la réaction de transcription inverse et d'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. en association avec le 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument. L'analyse statistique a été réalisée par une régression des probits. La limite de détection a été définie comme la dilution à laquelle la probabilité d'obtenir un résultat positif est égale à 95 %.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Limite de détection avec des échantillons d'ARN total			
		Intervalle de confiance à 95 %	
		Limite inférieure	Limite supérieure
95 % de positivité	dilution à 10 ^{-4.46}	dilution à 10 ^{-4.63}	dilution à 10 ^{-4.15}

La limite de détection a été définie à une dilution à 10^{-4.46}, correspondant à une concentration de % P190 comprise entre 0,0005 % (dilution à 10^{-4.5}) et 0,0081% (dilution à 10^{-4.0}). La quantité moyenne d'ABL enregistrée dans les tests pour la définition de la limite de détection était d'environ 200 000 copies par réaction.

Plage de mesure linéaire

La plage de mesure linéaire de ce test pour P190 avec de l'ARN total a été déterminée en utilisant le panel du matériel de référence étalonné « IVS-0032 Clonal Control RNA » (InVivoScribe, États-Unis). Le panel est constitué d'ARN total extrait d'une lignée cellulaire humaine positive pour BCR-ABL P190 e1a2 dilué dans de l'ARN total d'une lignée cellulaire humaine négative pour la translocation. Les dilutions utilisées allaient de l'ARN pur positif pour P190 (ARN de P190) à 10^{-6.0} (étapes de dilution de 1 log). Chaque échantillon du panel a été testé en 24 répliquats (300 ng d'ARN/réaction), en effectuant la réaction de transcription inverse et d'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. en association avec le 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument. L'analyse statistique a été réalisée par une régression linéaire.

L'analyse des données obtenues a démontré que le test présentait une réponse linéaire pour les points du panel allant de l'ARN pur positif pour P190 à une dilution de 10⁻⁴ avec un coefficient de corrélation linéaire supérieur à 0,99.

La limite supérieure de la mesure linéaire vérifiée dans ce test est l'ARN pur positif pour P190, correspondant à une concentration de % P190 égale à 69,9 %.

La limite inférieure de la mesure linéaire vérifiée dans ce test est la dilution à 10^{-4.0}, égale à la limite de détection et correspondant à une concentration de % P190 égale à 0,015 %.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Plage de mesure linéaire avec des échantillons d'ARN total			
Échantillon	Nombre moyen de copies de P190/réaction	Nombre moyen de copies log. de P190/réaction	Écart-type
ARN de P190	226 290,72	5,35	0,07
Dilution à 10 ^{-1.0}	28 245,34	4,45	0,07
Dilution à 10 ^{-2.0}	3 715,29	3,57	0,06
Dilution à 10 ^{-3.0}	535,35	2,72	0,10
Dilution à 10 ^{-4.0}	26,44	1,38	0,19

La quantité moyenne d'ABL enregistrée dans les tests pour la définition de la plage de mesure linéaire était d'environ 250 000 copies par réaction.

Les quantités mesurées d'ABL ont été vérifiées à l'aide du matériel de référence certifié européen « ERM®-AD623 » (IRMM, Belgique). Le matériel consiste en un panel de dilutions (étapes de dilution de 1,0 log) d'un ADN plasmidique contenant les produits d'amplification d'ABL. La concentration en ADN plasmidique a été calculée par la méthode de PCR numérique. Les dilutions utilisées allaient de 10⁶ copies/µl à 10¹ copies/µl. Chaque échantillon du panel a été testé en 9 répliquats en effectuant la réaction d'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. « BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit » et « BCR-ABL P190 ELITe Standard », en association avec le 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.

L'analyse des données, réalisée conformément aux recommandations de l'IRMM, a montré que les valeurs mesurées du matériel de référence certifié obtenu avec les produits ELITechGroup S.p.A. sont dans les limites de l'incertitude de mesure pour des quantités allant de 10⁶ copies/µl à 10¹ copies/µl (équivalent à 10 000 000 copies par réaction et à 100 copies par réaction, à raison de 10 µl par réaction) et sont donc alignées sur le matériel de référence certifié européen « ERM®-AD623 » (IRMM, Belgique).

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Alignement de la mesure d'ABL sur le matériel de référence européen ERM®-AD623		
Copies certifiées/µl	Copies mesurées/µl	Écart-type
1 108 000	1 121 250	86 262
108 000	111 797	14 429
10 300	12 769	2 119
1 020	1 314	261
104	146	31
10	16	3

Efficacité de détection et de quantification des polymorphismes possibles

La sensibilité analytique du test, ainsi que l'efficacité de la détection et de la quantification avec d'éventuels polymorphismes, a été évaluée en comparant des séquences avec des bases de données de nucléotides.

La vérification des régions d'hybridation des oligonucléotides amorces et des sondes fluorescentes (P190 et ABL) par alignement sur les séquences des gènes humains P190 et ABL disponibles dans la base de données a montré leur conservation et l'absence de mutations significatives.

Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été évaluée en analysant un panel d'échantillons cliniques positifs pour P190.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant 45 échantillons d'ARN archivés extraits de suspensions lymphomonocytaires et leucocytaires issues de patients leucémiques testés positifs pour P190 avec un produit d'amplification en temps réel. Les échantillons ont été extraits à l'aide d'une méthode validée dans le laboratoire de référence. Les réactions de transcription inverse et d'amplification de l'ARN total extrait (300 ng/réaction) ont été réalisées avec les produits ELITechGroup S.p.A sur le 7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillons	N	positifs	négatifs
ARN positif pour P190 issu de suspensions lymphomonocytaires et leucocytaires	45	41	4

Quarante-et-un échantillons ont été confirmés positifs (P190 détecté), avec une quantité moyenne d'ABL d'environ 115 000 copies/réaction. Lorsqu'ils ont été testés avec le produit de référence, les quatre échantillons négatifs discordants présentaient un très faible titre (< 3 copies par réaction) et un seul des deux répliquats était positif.

Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était de 91,1 %.

Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons négatifs, a été évaluée en analysant un panel d'échantillons cliniques négatifs pour P190.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 52 échantillons d'ARN archivés extraits de suspensions lymphomonocytaires et leucocytaires obtenus chez des patients testés négatifs pour P190 par un produit de diagnostic moléculaire commercial de DIV portant le marquage CE. Les échantillons ont été extraits à l'aide d'une méthode validée dans le laboratoire de référence. Les réactions de transcription inverse et d'amplification de l'ARN total extrait (300 ng/réaction) ont été réalisées avec les produits ELITechGroup S.p.A sur le 7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillons	N.	positifs	négatifs
ARN négatif pour P190 issu de suspensions lymphomonocytaires et leucocytaires	52	12	40

Dans le premier cas, quarante échantillons ont été confirmés comme négatifs du point de vue qualitatif (P190 non détecté), avec une quantité moyenne d'ABL d'environ 91 000 copies/réaction. Les douze échantillons positifs discordants présentaient une quantité de P190 extrêmement faible (environ 1 copie/réaction et pour un seul des doubles). La littérature rapporte la détection à faible titre, similaire à la maladie résiduelle minimale, du variant P190 de la translocation t(9;22) dans les échantillons de sang périphérique d'individus en bonne santé (Biernaux C. et al. and Bose S. et al.).

En tenant compte de ces données, il est possible de déclarer que la spécificité diagnostique du test était égale à 100 %.

Remarque : les données complètes et les résultats des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit avec les matrices et les instruments sont enregistrés dans le fichier technique du produit « BCR-ABL P190 ELITe MGB® Kit », FTP G07PLD190.

BIBLIOGRAPHIE

- J. Gabert et al. (2003) *Leukemia* 17: 2318 - 2357
 E. Beillard et al. (2003) *Leukemia* 17: 2474 - 2486
 H. Pfeifer et al. (2019) *Leukemia* 33: 1910 – 1922
 C. Biernaux et al. (1995) *Blood* 86: 3118 - 3122
 S. Bose et al. (1998) *Blood* 92: 3362 - 3367
 J. Song et al. (2011) *JMD* 13: 213 - 219
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Utiliser uniquement de l'ARN extrait à l'aide de ce produit à partir des échantillons cliniques suivants : suspensions lymphomonocytaires et leucocytaires du sang périphérique prélevé sur EDTA ou sur citrate, sang médullaire prélevé sur EDTA ou sur citrate.

Ne pas utiliser d'ARN extrait d'échantillons héparinés : l'héparine inhibe les réactions de transcription inverse et d'amplification des acides nucléiques et provoque des résultats invalides.

Ne pas utiliser d'ARN contaminé par l'hémoglobine, le dextran, l'éthanol Ficoll® ou le propanol-2 : ces substances peuvent inhiber la réaction de transcription inverse et les réactions d'amplification des acides nucléiques, et provoquer l'obtention de résultats non valides.

Des quantités d'ARN supérieures à 1,5 µg par réaction pourraient inhiber la réaction de transcription inverse et la réaction d'amplification des acides nucléiques.

Ne pas utiliser d'ARN avec de grandes quantités d'ADN génomique humain pouvant inhiber les réactions de transcription inverse et d'amplification des acides nucléiques et provoquer des résultats invalides.

Il n'existe pas de données disponibles concernant l'inhibition provoquée par des antibiotiques, des médicaments antiviraux, des médicaments de chimiothérapie ou immunosuppresseurs.

Les résultats obtenus avec ce produit dépendent de la qualité de l'identification, du prélèvement, du transport, de la conservation et de la préparation des échantillons. Afin d'éviter tout résultat incorrect, il est par conséquent nécessaire de prendre des précautions particulières pendant ces phases et de suivre scrupuleusement le mode d'emploi fourni avec les produits pour l'extraction des acides nucléiques.

En raison de sa grande sensibilité analytique, l'analyse d'amplification en temps réel des acides nucléiques utilisés dans ce produit est sujette à la contamination par des échantillons cliniques positifs pour P190, des contrôles positifs et des produits de réaction d'amplification eux-mêmes. La contamination conduit à l'obtention de résultats faux positifs. Le produit a été conçu de manière à réduire la contamination. Néanmoins, ce phénomène ne peut être évité qu'en suivant les bonnes pratiques de laboratoire et en respectant scrupuleusement les instructions fournies dans ce manuel.

Ce produit doit être manipulé par du personnel qualifié et dûment formé au traitement des échantillons biologiques potentiellement infectieux et des préparations chimiques classifiées comme dangereuses, afin de prévenir les accidents pouvant avoir des conséquences potentiellement graves pour l'utilisateur et les autres personnes.

Ce produit exige de porter des vêtements de travail et de disposer de zones appropriées dédiées au traitement des échantillons biologiques potentiellement infectieux et des préparations chimiques classifiées comme dangereuses, afin de prévenir les accidents pouvant avoir des conséquences potentiellement graves pour l'utilisateur et les autres personnes.

Afin d'éviter des résultats incorrects, le produit doit être manipulé par du personnel qualifié formé aux techniques de biologie moléculaire telles que l'extraction, la transcription inverse, l'amplification et la détection d'acides nucléiques.

Il est nécessaire de disposer de zones séparées pour la préparation du mélange réactionnel complet et l'extraction/la préparation des réactions d'amplification et l'amplification/la détection des produits d'amplification afin d'éviter d'obtenir des résultats « faux positifs ».

Ce produit nécessite l'utilisation de vêtements et d'instruments spéciaux pour l'extraction/la préparation des réactions d'amplification et pour l'amplification/la détection des produits d'amplification afin d'éviter d'obtenir des résultats « faux positifs ».

En raison de différences intrinsèques entre les technologies, il est recommandé aux utilisateurs d'effectuer des études de corrélation des méthodes afin d'évaluer les différences de technologie avant d'envisager d'en utiliser une nouvelle.

Un résultat négatif obtenu avec ce produit signifie que l'ARNm de P190 n'est pas détecté dans la réaction de transcription inverse à partir de l'ADN extrait de l'échantillon. Cependant, il ne peut pas être exclu que l'ARNm de P190 ait un titre inférieur à la limite de détection du produit (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »). Dans ce cas, le résultat pourrait être un faux négatif.

Les résultats obtenus avec ce produit peuvent parfois être non valides en raison d'une détection inefficace de l'ARNm d'ABL et nécessitent la réalisation d'un nouveau test, à partir de l'extraction, ce qui peut entraîner un retard dans l'obtention des résultats finaux.

Des polymorphismes possibles dans les régions du génome du patient couvertes par les amorces et les sondes du produit peuvent nuire à la détection et à la quantification de l'ARNm de P190 et d'ABL.

Comme avec tout autre dispositif médical de diagnostic, les résultats obtenus avec ce produit doivent être interprétés en tenant compte de l'ensemble des données cliniques et des autres analyses de laboratoire effectuées chez le patient.

Comme avec tout autre dispositif médical de diagnostic, il existe un risque résiduel d'obtention de résultats non valides, faux positifs et faux négatifs avec ce produit. Ce risque résiduel ne peut pas être éliminé ni réduit par la suite. Dans certains cas, ce risque résiduel pourrait contribuer à prendre de mauvaises décisions, avec des effets potentiellement dangereux pour le patient.

PROBLÈMES ET SOLUTIONS

Cible non détectée dans les réactions des Q - PCR Standard ou dans le contrôle positif ou coefficient de détermination non valide de la courbe d'étalonnage	
Causes possibles	Solutions
Préparation incorrecte du mélange réactionnel complet.	Vérifier les volumes de réactifs distribués pendant la préparation complète du mélange réactionnel.
Distribution incorrecte dans les puits de la microplaque.	Faire attention lors de la distribution des réactifs dans les puits de la microplaque et respecter la fiche de travail. Vérifier les volumes du mélange réactionnel complet distribué. Vérifier les volumes d'étalon distribué.
Paramétrage incorrect de la session d'analyse sur le système ELITe InGenius	Vérifier la position du mélange réactionnel, du contrôle positif ou des étalons. Vérifier le volume du mélange réactionnel, du contrôle positif ou des étalons.
Dégradation de la sonde.	Utiliser une nouvelle aliquote de PreMix.
Dégradation du mélange PCR MasterMix.	Utiliser une nouvelle aliquote de PCR MasterMix.
Dégradation du contrôle positif ou d'un étalon.	Utiliser une nouvelle aliquote de l'étalon ou du contrôle positif.
Erreur de paramétrage de l'instrument.	Vérifier les réglages de position pour les réactions d'étalonnage sur l'instrument. Vérifier le paramétrage du cycle thermique sur l'instrument.
Erreur de l'instrument.	Contactez le service technique d'ELITechGroup.

Cible détectée dans la réaction du contrôle négatif	
Causes possibles	Solutions
Distribution incorrecte dans les puits de la microplaque.	Éviter de renverser le contenu des tubes à essai d'échantillon. Toujours changer les cônes entre les échantillons. Faire attention lors de la distribution des échantillons, du contrôle négatif et des étalons dans les puits de la microplaque, et se conformer à la feuille de travail.
Paramétrage incorrect de la session d'analyse sur le système ELITe InGenius	Vérifier la position du mélange réactionnel ou du contrôle négatif. Vérifier le volume du mélange réactionnel ou du contrôle négatif.
Erreur lors du réglage de l'instrument.	Vérifier les réglages de position des échantillons, du contrôle négatif et des étalons sur l'instrument.
Microplaque mal scellée.	Faire attention lors du scellage de la microplaque.
Contamination de l'eau de qualité biologie moléculaire.	Utiliser une nouvelle aliquote d'eau.
Contamination du mélange réactionnel complet.	Préparer une nouvelle aliquote de mélange réactionnel complet.
Contamination de la zone d'extraction/de préparation des réactions d'amplification.	Nettoyer les surfaces et les instruments avec des détergents aqueux, laver les blouses de laboratoire, remplacer les tubes à essai et les cônes utilisés.
Erreur de l'instrument.	Contactez le service technique d'ELITechGroup.

Profil d'amplification de la cible inattendu ou cible non détectée dans la réaction de l'échantillon	
Causes possibles	Solutions
Préparation incorrecte du mélange réactionnel complet.	Vérifier les volumes de réactif distribués pendant la préparation complète du mélange réactionnel ; vérifier que le mélange RT EnzymeMix a été ajouté pour compléter le mélange réactionnel.
Distribution incorrecte dans les puits de la microplaque.	Éviter de renverser le contenu des tubes à essai d'échantillon. Toujours changer les cônes entre les échantillons. Faire attention lors de la distribution des échantillons dans les puits de la microplaque et respecter la fiche de travail.
Paramétrage incorrect de la session d'analyse sur le système ELITe InGenius	Vérifier la position du mélange réactionnel ou des échantillons. Vérifier le volume du mélange réactionnel ou des échantillons.
Inhibition due à des substances interférentes dans l'échantillon.	Répéter l'amplification avec une dilution à 1:2 de l'échantillon élué dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « PCR Only » (PCR uniquement). Répéter l'extraction et l'amplification de l'échantillon, en effectuant une étape de lavage supplémentaire du culot de globules blancs, afin d'éliminer tous les globules rouges avant la lyse.
Dégradation du mélange RT EnzymeMix.	Utiliser une nouvelle aliquote de RT EnzymeMix.
Problèmes lors du stockage du réactif.	Vérifier que le mélange RT EnzymeMix n'a pas été exposé à des températures supérieures à -20 °C pendant plus de 10 minutes. Vérifier que le mélange réactionnel complet n'a pas été exposé à la température ambiante pendant plus de 30 minutes.
Problèmes lors de l'extraction.	Vérifier la qualité et la concentration de l'ARN extrait.
Erreur de l'instrument.	Contactez le service technique d'ELITechGroup.

Fluorescence de bruit de fond irrégulière ou élevée dans les réactions	
Causes possibles	Solutions
Distribution incorrecte de l'échantillon.	Mélanger soigneusement à 3 reprises lors de l'ajout par pipetage des échantillons, du contrôle négatif et des étalons au mélange réactionnel complet. Éviter de créer des bulles à la fois au fond du puits et en surface.
Erreur de paramétrage de la référence.	Définir la plage de calcul de la référence dans les cycles au cours desquels la fluorescence de bruit de fond s'est déjà stabilisée (vérifier les données « Résultats » [Results], « Composant » [Component]) et la fluorescence du signal n'a pas encore commencé à augmenter – par ex., du cycle 6 au cycle 15. Utiliser le calcul automatique de la référence en activant l'option « Auto Baseline » (Référence auto).

Erreur 30103 sur le système ELITe InGenius	
Causes possibles	Solutions
Concentration trop élevée de la cible dans l'échantillon.	En cas d'observation d'une amplification significative sur la courbe de PCR : - répéter l'amplification avec une dilution à 1:10 de l'échantillon élué dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « PCR Only » (PCR uniquement) ou - répéter l'extraction avec une dilution à 1:10 de l'échantillon, dans de l'eau de qualité biologie moléculaire, lors d'une session d'analyse « Extraction + PCR » (Extract + PCR).

LÉGENDE DES SYMBOLES

-  Numéro de référence.
-  Limite supérieure de température.
-  Code de lot.
-  Date de péremption (dernier jour du mois).
-  Dispositif médical de diagnostic *in vitro*.
-  Conforme aux exigences de la directive européenne 98\79\CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.
-  Contenu suffisant pour « N » tests.
-  Attention, consulter le mode d'emploi.
-  Contenu.
-  Tenir à l'abri de la lumière du soleil.
-  Fabricant.

NOTE POUR L'ACQUÉREUR : LICENCE LIMITÉE

Ce produit contient des réactifs fabriqués par Life Technologies Corporation et commercialisés selon des accords de licence entre ELITechGroup S.p.A. et ses filiales et Life Technologies Corporation. Le prix d'achat de ce produit inclut des droits, limités et non transférables, qui permettent d'utiliser uniquement cette quantité du produit dans le seul objectif de satisfaire aux activités de l'acheteur qui sont directement liées à la réalisation de tests diagnostiques chez l'homme. Pour obtenir des informations sur l'achat d'une licence relative à ce produit à des fins autres que celles mentionnées ci-dessus, contacter le Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Téléphone : +1(760)603-7200. Fax : +1(760)602-6500. E-mail : outlicensing@thermofisher.com.

Les réactifs de détection ELITe® MGB sont couverts par un ou plusieurs des brevets américains numéros 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800, 9,169,256 et les brevets EP numéros 0819133, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939, ainsi que par des demandes de brevet actuellement en instance.

Cette licence limitée permet à la personne ou à l'entité légale à laquelle ce produit a été fourni de l'utiliser, ainsi que les données générées par son utilisation, uniquement à des fins de diagnostic chez l'homme. Ni ELITechGroup S.p.A. ni ses concédants de licence ne concèdent d'autres licences, expresses ou implicites, à toute autre fin.

« ELITe MGB® » et le logo « ELITe MGB® » sont des marques déposées au sein de l'Union européenne.
TRI Reagent® est une marque déposée de Molecular Research Center, Inc.
Ficol® est une marque déposée de GE Healthcare Bio-Sciences AB.
Maxwell® 16 est une marque déposée de Promega Corporation.



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The «BCR-ABL P190 ELITE MGB® Kit» product is a qualitative and quantitative, reverse transcription and amplification of nucleic acids assay for the detection of the mRNA of the BCR-ABL rearrangement, t(9;22) translocation, Philadelphia chromosome, variant P190 (P190) and for the quantification of the mRNA of P190 compared with the mRNA of the gene codifying the kinase protein Abelson (ABL). The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius®**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
Control	BCR-ABL (variant P190 e1a2)	FAM
	ABL (exons a2a3)	FAM

C. Validated matrix

- › **PBL isolated by buffycoat***

*Lympho-monocyte and/or leukocyte suspensions must be extracted from buffy coat from Peripheral Blood matrix

D. Kit content

P190 PreMix	ABL PreMix	PCR Master Mix	RT Enzyme Mix*
			
1 tube of 270 µL 36 reactions 6 freeze-thaw cycles PURPLE CAP	1 tube of 270 µL 36 reactions 6 freeze-thaw cycles NEUTRAL CAP	2 tubes of 820 µL 36 reactions 6 freeze-thaw cycles per tube NEUTRAL CAP	2 tubes of 20 µL 36 reactions 6 freeze-thaw cycles per tube BLACK CAP

- › Maximum shelf-life: 18 months
- › 18 determinations in duplicate
- › Storage Temperature: -20°C

* The RT EnzymeMix must not be exposed to temperatures higher than -20 °C for more than 10 minutes

E. Material required not provided in the kit

- › **ELITE InGenius instrument:** INT030
- › **ELITE InGenius SP RNA:** INT034SPRNA
- › **ELITE InGenius DNase I:** INT034DNASE
- › **Dnase Tube Adapter Kit:** G6431-000
- › **Cell Lysis Solution Promega*:** A7933
- › **RNA Lysis Buffer Promega*:** Z3051
- › **Thioglycerol Promega*:** A208B-C
- › **ELITE InGenius PCR Cassette:** INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set:** INT032CS
- › **BCR-ABL P190 - ELITE Positive Control:** CTRG07PLD190
- › **BCR-ABL P190 ELITE Standard:** STDG07PLD190
- › **ELITE InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **300 µL Filter Tips Axygen:** TF-350-L-R-S
- › **2 mL Sarstedt tube :** 72.694.005

* or equivalent

F. ELITE InGenius protocol

- | | | | |
|----------------------------|------------------------|----------------------------|---------|
| › Sample volume | 200 µL | › Report unitage | %P190 |
| › Total eluate volume | 100 µL | › Frequency of controls | 15 days |
| › PCR eluate input volume | 10 µL for each PCR mix | › Frequency of calibration | 60 days |
| › BCR-ABL Q-PCR Mix volume | 20 µL for each PCR mix | | |

G. Sample pre-treatment

The sample need a blood pre-treatment to separate leukocyte by buffy-coat isolation, according to laboratory use or referring the indications shown in the “Samples and Controls” paragraph of the instruction for use.

H. Procedure

For the Calibration follow the table below:

Target	Number of Samples	PreMix	PCR MasterMix	RT EnzymeMix
P190	5	30 µL	90 µL	0.9 µL
ABL	3	20 µL	60 µL	0.6 µL

For Controls and samples follow the table below:

Number of Samples	P190 or ABL PreMix	PCR MasterMix	RT Enzyme Mix
1	15 µL	45 µL	0.5 µL
2	25 µL	75 µL	0.8 µL
3	40 µL	120 µL	1.2 µL

The complete reaction mixtures should be used within 5 hours when kept on board in the refrigerated block. This time allows to carry out 1 working session of 3.5 hours and to start a second working session. It's important to mix them between the runs. The complete reaction mixtures **cannot be stored**.

I. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
(PBL) Peripheral Blood Leukocyte	0.0032%	100% 24/24*	96.7% 29/30*

*confirmed samples/ tested samples

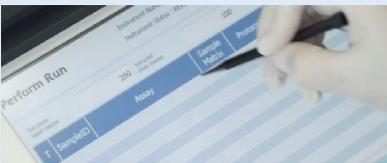
J. Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, reverse-transcription, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational modes are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

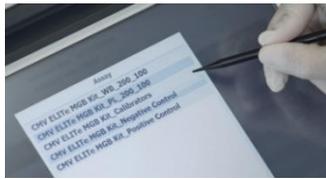
Before analysis

<p>1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed" or "Open"</p>	<p>Verify calibrators: BCR-ABL P190 Q-PCR Standard in the "Calibration menu". Verify controls: BCR-ABL P190 pos. and neg. controls in the "Control menu" NB: Both have been run, approved and not expired</p>	<p>2. Thaw all the reagents and prepare 2 complete reaction mixture (P190 and ABL Mix) by adding into the dedicated 2 mL tube the calculated volumes of the three components for each Mix. Mix by vortexing at low speed for 10 seconds three times, centrifuge the tube for 5 seconds The complete reaction mixture should be used within 5 hours when kept on board in the refrigerated block</p>
--	---	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

<p>1. Select "Perform Run" on the touch screen</p> 	<p>2. Verify the extraction volumes. Input: "200 µL", eluate: "100 µL"</p> 	<p>3. Scan the sample barcodes with handheld barcode reader or type the sample ID</p> 
---	---	--

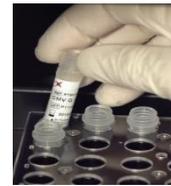
4. Select the "Assay protocol BCR-ABL P190 ELITE_PBL_200_100"



5. Select the sample position: sonication tube



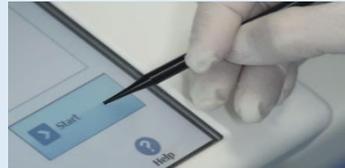
6. Load the complete reaction mixture on the "Inventory Block"



7. Load: PCR cassette, the ELITE InGenius SP RNA extraction cartridges, the ELITE InGenius DNase I and all the required consumables



8. Close the door Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

- 1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Elution tube"

6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4

7. Load the PCR cassette rack Load the complete reaction mixture in the inventory block

8. Close the door Start the run

9. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

- 1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: sonication tube

6. Load: the ELITE InGenius SP RNA extraction cartridges, the ELITE InGenius DNase I and all the required consumables

7. Close the door Start the run

8. Archive the eluate sample

BCR-ABL P190 ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Code: RTSG07PLD190



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The **BCR-ABL P190 ELITE MGB Kit** is a qualitative and quantitative, reverse transcription and amplification of nucleic acids assay for the detection of the mRNA of the BCR-ABL rearrangement, t(9;22) translocation, *Philadelphia* chromosome, variant P190 (P190) and for the quantification of the mRNA of P190 compared with the mRNA of the gene codifying the kinase protein Abelson (ABL). The assay is CE-IVD validated in combination with ABI PCR thermal cyclers (Thermo-Fisher) and laboratory validated extraction system such as the «Maxwell® CSC» (Promega) automatic extraction system or other equivalent products.

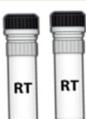
Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
Internal Control	BCR-ABL rearrangement (variant P190 e1a2)	FAM
	ABL (exons a2a3)	FAM

B. Validated matrix

- › **Peripheral blood collected in EDTA or sodium citrate or bone marrow ***
- › *Lympho-monocyte and/or leukocyte suspensions must be extracted from matrices mentioned above.

C. Kit content

P190 PreMix	ABL PreMix	PCR Master Mix	RT Enzyme Mix*
			
1 tube of 270 µL 50 reactions 6 freeze-thaw cycles PURPLE CAP	1 tube of 270 µL 50 reactions 6 freeze-thaw cycles NEUTRAL CAP	2 tubes of 820 µL 50 reactions 6 freeze-thaw cycles per tube NEUTRAL CAP	2 tubes of 20 µL 50 reactions 6 freeze-thaw cycles per tube CAP with BLACK INSERT

- › Maximum shelf-life: 18 months
25 reactions in duplicate
- › Storage Temperature: -20°C

* The RT Enzyme Mix must not be exposed to temperatures higher than -20 °C for more than 10 minutes

D. Material required not provided in the kit

- › **Maxwell® CSC:** AS6000
- › **7500 Fast Dx, 7300 and 7900 PCR Instrument**
- › **BCR-ABL P190 ELITE Standard:** STDG07PLD190
- › **BCR-ABL P190 - ELITE Positive Control:** CTRG07PLD190
- › **Molecular biology grade water**

E. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Maxwell - ABI	Peripheral blood or bone marrow	0,0015% P190% 10 ^{-4.3} Dilution	91.1% (41/45)*	100% (40/40)*

*confirmed samples/ tested samples

F. Procedure

The procedure below summarizes the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Complete reaction mixtures reconstitution

- › Thaw P190 PreMix and ABL PreMix, PCR MasterMix, vortex 10 sec three times, spin down 5 sec
- › RT Enzyme Mix should not be exposed to T° > -20°C more than 10min. Gently shake, spin down 5 sec
- › Prepare two 1.5 ml tube, one for the complete reaction mixture of P190 and the other for complete reaction mixture ABL
- › Calculate the required volume of the 3 components for each complete reaction mixture

Note: the volumes indicated in the table are sufficient for the set up of the reactions for reverse transcription and real time amplification required for the number of samples to be tested, negative control and four Q-PCR Standards, in duplicate plus an adequate safety margin.

Samples	PreMix	PCR MasterMix	RT Enzyme Mix
1	65 µL	195 µL	3.9 µL
2	75 µL	225 µL	4.5 µL
3	85 µL	255 µL	5.1 µL
4	95 µL	285 µL	5.7 µL
5	110 µL	330 µL	6.6 µL
6	120 µL	360 µL	7.2 µL
7	130 µL	390 µL	7.8 µL
8	140 µL	420 µL	8.4 µL
9	150 µL	450 µL	9.0 µL
10	160 µL	480 µL	9.6 µL
11	170 µL	510 µL	10.2 µL
12	180 µL	540 µL	10.8 µL
13	190 µL	570 µL	11.4 µL
14	205 µL	615 µL	12.3 µL
15	215 µL	645 µL	12.9 µL
16	225 µL	675 µL	13.5 µL
17	235 µL	705 µL	14.1 µL
18	245 µL	735 µL	14.7 µL
19	255 µL	765 µL	15.3 µL

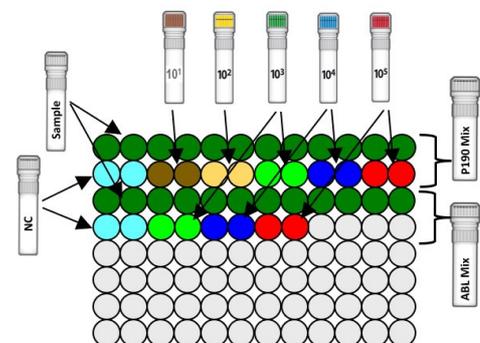
Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300, 7900 PCR instruments

1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "P190" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "ABL" detector with "FAM" and quencher "none"
4. Set passive reference as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300, 7900 instruments
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 56°C

Stage	Temperature	Timing
Reverse Transcription	50°C	20 min
Initial Denaturation	94°C	5 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	56°C	30 sec
45 cycles	72°C	15 sec

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw BCR-ABL P190 Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Prepare the "P190" and "ABL" complete reaction mixtures by adding the required volume of three components as reported in table above. The complete reaction mixture should be used within 30 min and cannot be stored
4. Pipet **20 µL** of "P190" complete reaction mixture after reconstitution in the microplate wells in use
5. Pipet **20 µL** of "ABL" complete reaction mixture after reconstitution in the microplate wells in use
6. Add, **10 µL** of extracted RNA in sample wells, **10 µL** of molecular grade water in Negative Control well, and **10 µL** of the 5 Q-PCR Standards in standard curve wells
7. Extracted RNA samples, Q-PCR Standards and Negative Control must be pipetted in duplicate
8. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
9. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification - Threshold for quantitative analysis

Instrument	P190 FAM	ABL FAM
7500 Fast Dx Real Time PCR	0.1	0.1
7300 and 7900 Real Time PCR	0.1	0.1

Interpretation - quantitative results

Detector FAM	mRNA	Quantity of mRNA
Ct determined	Detected	Quantity
Ct Undetermined	Not detected	0

Sample	mRNA of P190	mRNA of ABL	Calculated Quantity of mRNA of P190	Calculated Quantity of mRNA of ABL
1 st replicate	DETECTED	Quantity \geq 10,000	Sum Quantity	Sum Quantity
2 nd replicate	DETECTED	Quantity \geq 10,000		
1 st replicate	NOT DETECTED	Quantity \geq 10,000	0	Sum Quantity
2 nd replicate	NOT DETECTED	Quantity \geq 10,000		
1 st replicate	Quantity < 10 copies	Quantity \geq 10,000	Quantity	Sum Quantity
2 nd replicate	NOT DETECTED	Quantity \geq 10,000		
1 st replicate	Quantity > 10 copies	Quantity \geq 10,000	Retest the sample	
2 nd replicate	NOT DETECTED	Quantity \geq 10,000		
1 st replicate	DETECTED or NOT DETECTED	Quantity < 10,000	Retest the sample	
2 nd replicate	DETECTED or NOT DETECTED	Quantity \geq 10,000		
1 st replicate	DETECTED or NOT DETECTED	Quantity < 10,000	Retest the sample	
2 nd replicate	DETECTED or NOT DETECTED	Quantity < 10,000		

Percentage of copies of P190 mRNA normalized to ABL mRNA copies (P190 %)

Detector FAM	mRNA	P190 %
P190 Ct determined	Detected	$\frac{\text{Calculated Quantity of mRNA of P190}}{\text{Calculated Quantity of mRNA of ABL}} \times 100$
ABL Ct determined	Detected (Quantity \geq 10,000)	