

	 EMPOWERING IVD
	 ELITechGroup S.p.A. C.so Svizzera, 185 10149 Torino ITALY
	Uffici: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11 E. mail: emd.support@elitechgroup.com sito WEB: www.elitechgroup.com

## AVVERTENZA del 28/11/2023

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

### «BCR-ABL P210 ELITe MGB<sup>®</sup> Kit» Ref. RTSG07PLD210

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Aggiornamento delle condizioni di trasporto e stoccaggio dei campioni primari*

Composizione, utilizzo e prestazioni del prodotto restano del tutto invariate.

### NOTA BENE

	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 P210 ELITE MGB® Kit**  
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA  
e l'amplificazione Real Time del cDNA

REF RTSG07PLD210

Il prodotto trova impiego, insieme ai dati clinici e ad altri esami di laboratorio, come aiuto nella diagnosi e nel monitoraggio dei casi di leucemia mieloide cronica (CML), leucemia mieloide acuta (AML) e leucemia linfoblastica acuta (ALL), positive per questo marcatore.

I risultati ottenuti con questo prodotto possono essere allineati all'International Scale (IS) utilizzando il Fattore di Conversione che può essere calcolato con il prodotto «**PHILADELPHIA P210 RNA Reference**» di ELITechGroup S.p.A., calibrato rispetto al "1st World Health Organization (WHO) International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL translocation by RQ-PCR".

**BCR-ABL P210 ELITE MGB® Kit**  
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e  
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF RTSG07PLD210



**SOMMARIO**

USO PREVISTO	pag. 1
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 4
MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 4
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	pag. 4
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 5
ELITE INGENIUS®	pag. 7
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 7
PROCEDURA	pag. 8
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 16
ALTRI SISTEMI	pag. 18
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 18
PROCEDURA	pag. 19
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 28
BIBLIOGRAFIA	pag. 30
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 31
PROBLEMI E SOLUZIONI	pag. 32
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 34
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 34

**USO PREVISTO**

Il prodotto «**BCR-ABL P210 ELITE MGB® Kit**» è un saggio qualitativo e quantitativo di trascrizione inversa e amplificazione degli acidi nucleici per la rilevazione del mRNA del riarrangiamento BCR-ABL, traslocazione t(9;22), cromosoma Philadelphia, variante P210 (P210) e per la quantificazione dell'mRNA di P210 normalizzato rispetto all'mRNA del gene codificante la proteinchinasi Abelson (ABL) in campioni di RNA estratto da sospensioni di linfomonociti e sospensioni di leucociti da campioni di sangue periferico, sangue midollare.

**PRINCIPIO DEL SAGGIO**

Il saggio prevede l'esecuzione di una reazione di trascrizione inversa e di amplificazione real time (metodica one-step) con un termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza (thermal cycler per amplificazione real time).

Ciascun campione di RNA estratto dai campioni in esame è utilizzato in **dupplicato per la reazione specifica per una regione dell'mRNA P210 (target)** e in **dupplicato per la reazione specifica per una regione dell'mRNA ABL (controllo)**.

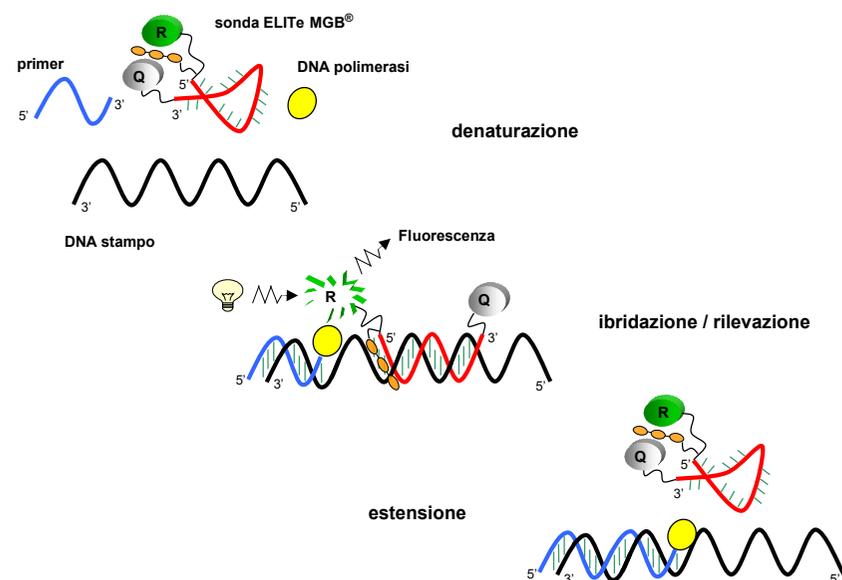
La sonda con tecnologia ELITE MGB® specifica per il cDNA di P210, marcata con il fluoroforo FAM, è attivata quando ibrida con il prodotto specifico della reazione di amplificazione per il cDNA di P210.

La sonda con tecnologia ELITE MGB® specifica per il cDNA di ABL, marcata con il fluoroforo FAM, è attivata quando ibrida con il prodotto specifico della reazione di amplificazione per il cDNA di ABL.

L'emissione della fluorescenza aumenta con l'aumentare dei prodotti specifici della reazione di amplificazione ed è misurata e registrata dall'apparecchio. L'elaborazione dei dati permette di rilevare la presenza ed il titolo dell'mRNA di P210 e di ABL nel campione di partenza.

Il saggio è stato validato per il suo utilizzo in associazione ai sistemi descritti in questo manuale.

Nella figura di seguito è illustrato in sintesi il meccanismo di attivazione e di emissione della fluorescenza della sonda con tecnologia ELITE MGB®. Notare come la sonda non è idrolizzata durante il ciclo di amplificazione.



**DESCRIZIONE DEL PRODOTTO**

Il prodotto «BCR-ABL P210 ELITE MGB® Kit» fornisce i seguenti componenti:

• **P210 PreMix**

Una miscela di oligonucleotidi, specifici per la trascrizione inversa e l'amplificazione real time di P210, in una soluzione stabilizzante, **prealiquotata in una provetta** (tappo con inserto BIANCO). Ogni provetta contiene **270 µL** di soluzione, sufficiente per almeno **36 reazioni** in associazione con «**ELITE InGenius®**» e **50 reazioni** in associazione con altri sistemi.

Gli oligonucleotidi di innesco e la sonda per P210 (stabilizzata dal gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo FAM e inattivata da un quencher non fluorescente) sono specifici per una regione dell'mRNA che origina dal riarrangiamento **BCR-ABL (variante P210 b3a2 e variante P210 b2a2)**.

La miscela fornisce anche il fluoroforo AP593, usato invece del ROX o del CY5 come riferimento passivo per la normalizzazione della fluorescenza.

• **ABL PreMix**

Una miscela di oligonucleotidi, specifici per la trascrizione inversa e l'amplificazione real time di ABL, in una soluzione stabilizzante, **prealiquotata in una provetta** (tappo NEUTRO senza inserto). Ogni provetta contiene **270 µL** di soluzione, sufficiente per almeno **36 reazioni** in associazione con «**ELITE InGenius®**» e **50 reazioni** in associazione con altri sistemi.

Gli oligonucleotidi di innesco e la sonda per ABL (stabilizzata dal gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo FAM e inattivata da un quencher non fluorescente) sono specifici per una regione dell'mRNA del gene umano codificante **ABL (esoni a2a3)**.

La miscela fornisce anche il fluoroforo AP593, usato invece del ROX o del CY5 come riferimento passivo per la normalizzazione della fluorescenza.

• **PCR MasterMix**

Una miscela ottimizzata di reagenti per la trascrizione inversa e l'amplificazione real time in una soluzione stabilizzante, **prealiquotata in due provette** (tappo NEUTRO senza inserto). Ogni provetta contiene **820 µL** di soluzione, sufficiente per almeno **36 reazioni** in associazione con «**ELITE InGenius®**» e **50 reazioni** in associazione con altri sistemi.

La miscela fornisce il tampone, il magnesio cloruro, i nucleotidi trifosfati e l'enzima Taq DNA Polimerasi ad attivazione termica (hot start).

• **RT EnzymeMix**

Una miscela ottimizzata per la trascrizione inversa in una soluzione stabilizzante, **prealiquotata in due provette** (tappo con inserto NERO). Ogni provetta contiene **20 µL** di soluzione, sufficiente per almeno **36 reazioni** in associazione con «**ELITE InGenius®**» e **50 reazioni** in associazione con altri sistemi.

La miscela fornisce gli enzimi per la trascrizione inversa.

Il prodotto consente di effettuare **18 determinazioni in duplicato per l'mRNA di P210 e 18 determinazioni in duplicato per l'mRNA di ABL**, in associazione con «**ELITE InGenius®**» standard e controlli compresi.

Il prodotto consente di effettuare **25 determinazioni in duplicato per l'mRNA di P210 e 25 determinazioni in duplicato per l'mRNA di ABL**, in associazione con 7300 Real Time PCR System, 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument e 7900 Real-Time PCR System, standard e controlli compresi. In un'unica sessione è quindi possibile analizzare un numero massimo di **19 campioni clinici** (in condizioni di utilizzo ottimali).

**MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO**

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei pericoli
<b>P210 PreMix</b>	miscela di oligonucleotidi di innesco e di sonda Tappo BIANCO	1 x 270 µL	-
<b>ABL PreMix</b>	miscela di oligonucleotidi di innesco e di sonda Tappo NEUTRO	1 x 270 µL	-
<b>PCR MasterMix</b>	miscela di reagenti ottimizzati per la trascrizione inversa e l'amplificazione real time Tappo NEUTRO	2 x 820 µL	-
<b>RT EnzymeMix</b>	enzima trascrittasi inversa Tappo con inserto NERO	2 x 20 µL	-

**MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO**

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o simili.
- Miscelatore vortex.
- Microcentrifuga da banco (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a dispensazione positiva (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Acqua per biologia molecolare.
- Tubi Sarstedt 2.0 mL con fondo conico e tappo a vite (Sarstedt Ref. 72.694.005)
- Microprovette per biologia molecolare in polipropilene da 1,5 mL.
- Termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza 7300 Real Time PCR System, 7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument o 7900 Real-Time PCR System calibrato come previsto dal fabbricante.

**ALTRI PRODOTTI RICHIESTI**

I reagenti per l'estrazione dell'RNA dai campioni da analizzare, le micropiastre per l'amplificazione, i DNA standard a quantità nota **non** sono inclusi in questo prodotto.

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del RNA, dell'amplificazione e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare con lo strumento «**ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT030), si consiglia l'impiego dei seguenti prodotti generici: cartucce di estrazione «**ELITE InGenius® SP RNA**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT034SPRNA), «**ELITE InGenius DNase I**» (ELITechGroup S.p.A. codice INT034DNASE), «**Dnase Tube Adapter Kit**» (codice G6431-000), e materiali di consumo per estrazione ed amplificazione di acidi nucleici da campioni biologici «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A. codice INT032CS), «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., codice F2102-000), «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT035PCR) e «**300µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, codice TF-350-L-R-S).

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del RNA, dell'amplificazione real time e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare sono richiesti lo strumento «**ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT030) e i seguenti Assay protocols specifici (ELITechGroup S.p.A.):

- per i calibratori «**BCR-ABL P210 ELITE STD\_P210**» e «**BCR-ABL P210 ELITE STD\_ABL**»,
- per il controllo positivo di amplificazione «**BCR-ABL P210 ELITE\_PC**»,
- per il controllo negativo di amplificazione «**BCR-ABL P210 ELITE\_NC**»,
- per i campioni in analisi «**BCR-ABL P210 ELITE\_PBL\_200\_100**».

Per l'estrazione dell'RNA dai campioni da analizzare utilizzare un prodotto generico validato dal laboratorio come ad esempio il sistema di estrazione automatico «Maxwell® CSC» (Promega, codice AS6000) con i reagenti Maxwell® CSC RNA Blood Kit (Promega, codice AS1410) o altri prodotti equivalenti.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento 7300 Real-Time PCR System o 7900 Real-Time PCR System, è richiesto l'impiego del prodotto generico «Q - PCR Microplates» (ELITechGroup S.p.A., codice RTSACC01) micropiastre con pozzetti da 0,2 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument o 7900 Real-Time PCR System, è richiesto l'impiego del prodotto generico «Q - PCR Microplates Fast» (ELITechGroup S.p.A., codice RTSACC02) micropiastre con pozzetti da 0,1 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time.

Per la rilevazione e quantificazione dell'mRNA di P210 e dell'mRNA di ABL è richiesto l'impiego del prodotto «BCR-ABL P210 - ELITE Positive Control» (ELITechGroup S.p.A., codice CTRG07PLD210), controllo positivo di DNA plasmidico.

Per la rilevazione e quantificazione dell'mRNA di P210 rispetto all'mRNA di ABL è richiesto l'impiego del prodotto «BCR-ABL P210 ELITE Standard» (ELITechGroup S.p.A., codice STDG07PLD210), cinque diluizioni di DNA plasmidico a quantità nota per ottenere le curve standard P210 e ABL.

Per la conversione dei risultati all'International Scale (IS) del "1<sup>st</sup> World Health Organization (WHO) International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL translocation by RQ-PCR" si consiglia l'impiego del prodotto «PHILADELPHIA P210 RNA Reference» (ELITechGroup S.p.A., codice SPG07-210), quattro miscele di RNA totale a quantità nota per ottenere il fattore di conversione.

Per il pre-trattamento del sangue, utilizzare un prodotto generico validato, come ad esempio Cell Lysis Solution (Promega, codice A7933), RNA Lysis Buffer (Promega, codice Z3051) e Thioglycerol (Promega, codice A208B-C), o reagenti equivalenti come ad esempio Solution A (Promega, codice MC130A), Solution B (Promega, codice MC131A) e Thioglycerol (Promega, codice MC132A).

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

**Questo prodotto è riservato esclusivamente all'uso *in vitro*.**

### Avvertenze e precauzioni generali

Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Il materiale che viene a contatto con i campioni biologici deve essere trattato con ipoclorito di sodio al 3% per almeno 30 minuti oppure trattato in autoclave a 121 °C per un'ora prima di essere smaltito.

Manipolare e smaltire tutti i reagenti e tutti i materiali usati per effettuare il saggio come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Evitare di produrre schizzi o aerosol. I rifiuti devono essere trattati e smaltiti secondo le opportune regole di sicurezza. Il materiale monouso combustibile deve essere incenerito. I rifiuti liquidi contenenti acidi o basi devono essere neutralizzati prima dell'eliminazione.

Indossare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi / la faccia.

Non pipettare a bocca alcuna soluzione.

Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree di lavoro.

Lavarsi bene le mani dopo avere maneggiato i campioni e i reagenti.

Eliminare i reagenti avanzati ed i rifiuti secondo le norme vigenti.

Leggere attentamente tutte le istruzioni fornite nel prodotto prima di eseguire il saggio.

Attenersi alle istruzioni fornite nel prodotto durante l'esecuzione del saggio.

Rispettare la data di scadenza del prodotto.

Utilizzare solo i reagenti presenti nel prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

### Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

Le procedure di biologia molecolare, come l'estrazione, la trascrizione inversa, l'amplificazione e la rilevazione di acidi nucleici, richiedono personale competente e addestrato per evitare il rischio di risultati errati, in particolare a causa della degradazione degli acidi nucleici dei campioni o della contaminazione dei campioni da parte di prodotti di amplificazione.

Per l'allestimento manuale, è necessario disporre di aree separate per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione. Mai introdurre un prodotto di amplificazione nell'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.

Per l'allestimento manuale, è necessario disporre di camici, guanti e strumenti dedicati per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione. Mai trasferire camici, guanti e strumenti dall'area per l'amplificazione/ rilevazione dei prodotti di amplificazione all'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.

I campioni devono essere dedicati esclusivamente a questo tipo di analisi. I campioni devono essere manipolati sotto una cappa a flusso laminare. Provette contenenti campioni diversi non devono mai essere aperte contemporaneamente. Le pipette utilizzate per manipolare i campioni devono essere dedicate solo a questo uso. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzare puntali con filtro per aerosol. I puntali utilizzati devono essere sterili, esenti da DNasi ed RNasi, esenti da DNA ed RNA.

I reagenti devono essere manipolati sotto una cappa a flusso laminare. I reagenti necessari per l'amplificazione devono essere preparati in modo da essere utilizzati in una singola sessione. Le pipette utilizzate per manipolare i reagenti devono essere dedicate solo a questo uso. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzare puntali con filtro per gli aerosol. I puntali utilizzati devono essere sterili, esenti da DNasi ed RNasi, esenti da DNA ed RNA.

I prodotti di amplificazione devono essere manipolati in modo da limitarne al massimo la dispersione nell'ambiente per evitare la possibilità di contaminazioni. Le pipette utilizzate per manipolare i prodotti di amplificazione devono essere dedicate solo a questo uso.

### Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

#### • P210 PreMix

La **P210 PreMix** deve essere conservata al buio a -20 °C.

La **P210 PreMix** può essere congelata e scongelata per un massimo di **sei volte**: ulteriori cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

#### • ABL PreMix

La **ABL PreMix** deve essere conservata al buio a -20 °C.

La **ABL PreMix** può essere congelata e scongelata per un massimo di **sei volte**: ulteriori cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

#### • PCR MasterMix

La **PCR MasterMix** deve essere conservata a -20 °C.

La **PCR MasterMix** può essere congelata e scongelata per un massimo di **sei volte**: ulteriori cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

#### • RT EnzymeMix

L'**RT EnzymeMix** deve essere conservato a -20 °C.

L'**RT EnzymeMix** non deve rimanere esposto a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti per un massimo di **sei volte**.

**ELITE InGenius®**

**CAMPIONI E CONTROLLI**

**Campioni**

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

**Sangue periferico raccolto in EDTA o citrato**

Il sangue periferico raccolto in EDTA o sodio citrato, utilizzato per la preparazione delle sospensioni di linfomonociti e leucociti per l'estrazione dell'RNA, deve essere raccolto secondo le linee guida del laboratorio, trasportato e conservato a temperatura ambiente (+21 ±5 °C) per un massimo di 24 ore.

Non congelare il sangue periferico in modo da evitare la degradazione dell'RNA.

Quando si parte da sangue periferico è consigliabile eseguire la separazione dei leucociti secondo le indicazioni del laboratorio o con la seguente procedura.

Trasferire 10 – 14 mL di sangue periferico raccolto in EDTA o citrato, in un tubo da 15 ml, dopo averlo miscelato accuratamente per inversione. Centrifugare per 10 minuti a 3000 RCF. Dispensare 5 ml di Cell Lysis Solution (Promega, codice A7933), in un nuovo tubo da 15 ml. Prelevare con una pipetta da 1 ml il buffy-coat ottenuto dopo centrifugazione e trasferirlo nel tubo contenente Cell Lysis Solution, aspirando e rilasciando fino a quando le cellule non saranno all'interno del tubo e la pipetta non risulterà priva di materiale. Incubare 10 minuti a temperatura ambiente; miscelando i campioni per inversione (NO VORTEX) almeno per 3-4 volte. Centrifugare per 10 minuti a 3000 RCF.

**Nota:** Il quantitativo ideale di cellule bianche è rappresentato in scala 1:1 nella seguente figura.



Eliminare il surnatante e risospendere in 2 ml di Cell Lysis Solution trasferendolo in un tubo da 2 mL. Centrifugare nuovamente per circa 2 minuti a 3000 RCF. Eliminare con cura il surnatante (attenzione a rimuovere le tracce di globuli rossi sopra al pellet di cellule bianche) e risospendere il pellet in 200 µL di Lysis Solution (1 mL di RNA Lysis Buffer, Promega, codice Z3051 + 20 µL di 1-Thioglycerol, Promega, codice A208B-C).

**Nota:** quando si esegue l'estrazione di acidi nucleici con **ELITE InGenius®** e con **ELITE InGenius® Software** versione 1.3 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **BCR-ABL P210 ELITE\_PBL\_200\_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione ed eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

**Stanze interferenti**

L'RNA estratto dal campione di partenza non deve contenere eparina, emoglobina, Ficoll®, etanolo o propan-2-olo, per evitare fenomeni di inibizione e la comparsa di frequenti risultati non validi.

Quantità di RNA estratto superiori a 2,0 µg per reazione possono inibire la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione real time.

Quantità di DNA genomico umano superiori a 100 ng per reazione presenti nell'RNA estratto dal campione possono interferire o inibire la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione real time.

**PROCEDURA**

La procedura di utilizzo del prodotto **BCR-ABL P210 ELITE MGB® Kit** con il sistema **ELITE InGenius** comprende tre fasi:

- Verifica che il sistema sia pronto
- Impostazione della sessione
- Esame e approvazione dei risultati

**Verifica che il sistema sia pronto**

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:

- accendere **ELITE InGenius** e selezionare la modalità "**CLOSED**";
- verificare che i calibratori (**BCR-ABL P210 Q-PCR Standard**) siano processati, approvati e non scaduti (Status) in associazione con il lotto di reagenti di amplificazione da utilizzare. In caso non vi siano calibratori approvati o validi, processarli come descritto nei paragrafi seguenti.
- verificare che i controlli di amplificazione (Controls - **BCR-ABL P210 Positive Control**, **BCR-ABL P210 Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (Status), in associazione con il lotto di reagenti di amplificazione da utilizzare. In caso non vi siano controlli approvati o validi, processarli come descritto nei paragrafi seguenti.
- scegliere il tipo di corsa, seguendo le istruzioni della Graphical User Interface (GUI) per impostare la sessione utilizzando i protocolli dei saggi forniti da ELITechGroup. Questi protocolli IVD sono stati validati specificamente con i kit **ELITE MGB**, le matrici e lo strumento **ELITE InGenius**.

Il protocollo di saggio disponibile per **BCR-ABL P210 ELITE MGB® Kit** è descritto nella tabella seguente.

Protocollo del saggio per BCR-ABL P210 ELITE MGB® kit			
Nome	Matrice	Unità di misura	Caratteristiche
<b>BCR-ABL P210 ELITE_PBL_200_100</b>	Peripheral Blood Leukocyte	%P210	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Sonicazione: NO Controllo Interno: NO Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume del campione: 10 µL

Se il protocollo del saggio di interesse, non è presente nel sistema, contattare il Servizio Clienti locale di ELITechGroup.

**Impostazione della sessione**

Il prodotto **BCR-ABL P210 ELITE MGB® Kit** in associazione a **ELITE InGenius** può essere utilizzato per eseguire:

- A. Corsa integrata (Extract + PCR),
- B. Corsa di amplificazione (PCR only),
- C. Corsa di calibrazione (PCR only),
- D. Corsa di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo (PCR only)

Tutti i parametri necessari per l'esecuzione della sessione sono inclusi nell'Assay protocol disponibile sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l'Assay protocol.

**Nota bene:** il sistema **ELITE InGenius** può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile inviare le informazioni di impostazione della sessione. Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

Prima di iniziare la sessione è necessario:

1. prelevare e scongelare per 30 minuti a temperatura ambiente (+18 / 25 °C) le provette di **P210 PreMix** (tappo BIANCO) e **ABL PreMix** (tappo NEUTRO) necessarie per la sessione ricordando che il contenuto di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **36 reazioni**. Agitare con vortex per 10 secondi per tre volte le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in un blocco freddo;
2. prelevare e scongelare per 30 minuti a temperatura ambiente (+18 / 25 °C) le provette di **PCR MasterMix** (tappo NEUTRO) necessarie per la sessione ricordando che il contenuto di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **36 reazioni**. Agitare con vortex per 10 secondi per tre volte le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in un blocco freddo;

3. prelevare al momento dell'uso le provette di **RT EnzymeMix** (tappo NERO) necessarie per la sessione ricordando che il contenuto di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **36 reazioni**. Mescolare delicatamente e centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in un blocco freddo.

**Nota bene:** L' **RT EnzymeMix** non deve rimanere esposto a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti.

4. preparare un tubo da 2 mL con tappo a vite (Sarstedt Ref. 72.694.005, not included in the kit) per ogni **miscela completa di reazione**, contrassegnandolo in modo riconoscibile con un pennarello indelebile.

5. Calcolare i volumi dei tre componenti forniti nel kit che sono necessari per preparare le **miscele complete di reazione**:

a. Per le Calibrazioni seguire la tabella seguente:

Target	Numero di campioni	PreMix	PCR MasterMix	RT EnzymeMix
P210	5	30 µL	90 µL	0.9 µL
ABL	3	20 µL	60 µL	0.6 µL

b. Per Controlli campioni seguire la tabella seguente:

Numero di campioni	P210 or 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. Preparare le **miscele complete di reazione** aggiungendo nel tubo da 2 mL dedicato i volumi dei tre componenti forniti.

7. Agitare con **vortex a bassa velocità** per 10 secondi per tre volte, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in un blocco freddo.

**Nota bene:** le **miscele complete di reazione** devono essere usate entro **5 ore** quando mantenute "on board" nel blocco refrigerato. Le miscele complete di reazione non possono essere conservate. Questo permette di correre una sessione di lavoro da 3.5 ore e iniziare una seconda sessione di lavoro a seguire.

Le principali operazioni per l'impostazione dei quattro tipi di corsa sono descritte di seguito.

#### A Corsa integrata

Per impostare la corsa integrata, partendo da campioni pre-trattati, seguire le indicazioni seguenti come da **Graphical User Interface (GUI)**:

1. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
2. Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
3. Per ogni "Track" di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
4. Selezionare il protocollo del test da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio BCR-ABL P210 ELITE\_PBL\_200\_100).
5. Assicurarsi che il "Protocol" visualizzato sia: "Extract + PCR".
6. Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position" sia "Extraction Tube (bottom row)". Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
7. Caricare le **miscele complete di reazione** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.

9. Caricare le "PCR Cassette", le cartucce di estrazione "ELITE InGenius SP RNA" e "ELITE InGenius DNase I", tutti i consumabili e i campioni da estrarre nella posizione indicata al punto 8, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.

10. Chiudere lo sportello dello strumento.

11. Premere "Start" per avviare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'**ELITE InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

**Nota bene:** Alla fine della corsa il campione estratto rimasto nell'"Elution tube" deve essere rimosso dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 °C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

**Nota bene:** Alla fine della corsa le "PCR Cassette", con i prodotti di reazione e i consumabili, devono essere rimosse dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

**Nota bene:** Alla fine della corsa le **miscele complete di reazione** possono essere conservate a bordo nel blocco refrigerato, tenendo conto del tempo massimo di 5 ore totali.

#### B Corsa di amplificazione

Per impostare la corsa di amplificazione, partendo dal RNA estratto, seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
2. Anche se non verrà effettuata alcuna estrazione, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
3. Per ogni "Track" di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
4. Selezionare il protocollo del test da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio BCR-ABL P210 ELITE\_PBL\_200\_100).
5. Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
6. Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione eluato nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)". Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
7. Caricare le **miscele complete di reazione** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Caricare i campioni degli acidi nucleici estratti e le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per continuare l'operazione successiva.
10. Chiudere la porta dello strumento.
11. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'**ELITE InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

**Nota bene:** Alla fine della corsa il campione estratto rimasto rimasto nell'"Elution tube" deve essere rimosso dallo strumento, tappato identificato e conservato a -20 ° C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

**Nota bene:** Alla fine della corsa le "PCR Cassette", con i prodotti di reazione e i consumabili, devono essere rimosse dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

**Nota bene:** Alla fine della corsa le **miscele complete di reazione** possono essere conservate a bordo nel blocco refrigerato, tenendo conto del tempo massimo di 5 ore totali.

### C Corsa di calibrazione

Per impostare la corsa di calibrazione per Q-PCR Standards seguire le seguenti indicazioni da GUI:

1. Scongellare un tubo di BCR-ABL P210 Q - PCR Standard per ogni livello per la calibrazione P210 (Cal1: BCR-ABL Q-PCR Standards 10<sup>1</sup>, Cal2: BCR-ABL Q-PCR Standards 10<sup>2</sup>, Cal3: BCR-ABL Q-PCR Standards 10<sup>3</sup>, Cal4: BCR-ABL Q-PCR Standards 10<sup>4</sup>, Cal5: BCR-ABL Q-PCR Standards 10<sup>5</sup>). Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi..
2. Scongellare un altro tubo di BCR-ABL P210 Q - PCR Standard 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> and 10<sup>3</sup> per la calibrazione ABL (Cal3: BCR-ABL Q-PCR Standards 10<sup>3</sup>, Cal4: BCR-ABL Q-PCR Standards 10<sup>4</sup>, Cal5: BCR-ABL Q-PCR Standards 10<sup>5</sup>). Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi..
3. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
4. Anche se non verrà effettuata alcuna estrazione, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
5. Per la calibrazione P210 selezionare il protocollo da utilizzare "BCR-ABL P210 ELITE STD\_P210" nella colonna "Assay" e compilare il numero di lotto e la data di scadenza per il **BCR-ABL P210 Q-PCR Standard**.
6. Per la calibrazione ABL selezionare il protocollo da utilizzare "BCR-ABL P210 ELITE STD\_ABL" nella colonna "Assay" e compilare il numero di lotto e la data di scadenza per il **BCR-ABL P210 Q-PCR Standard**. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
7. Caricare le **miscele complete di reazione** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Caricare i tubi di calibrazione **BCR-ABL P210 Q-PCR Standard** e le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva. Fare attenzione a caricare gli standard nella corretta posizione, seguendo le istruzioni GUI
10. Chiudere la porta dello strumento.
11. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'**ELITE InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

**Nota bene:** Alla fine della corsa lo standard **BCR-ABL P210 Q-PCR Standard** rimasto deve essere rimosso dallo strumento, tappato e conservato a -20 °C.

**Nota bene:** Alla fine della corsa le "PCR Cassette" con i prodotti di reazione e i consumabili, devono essere rimosse dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

**Nota bene:** Alla fine della corsa le **miscele complete di reazione** possono essere conservate a bordo nel blocco refrigerato, tenendo conto del tempo massimo di 5 ore totali.

### D. Corsa di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo

Per impostare la corsa di amplificazione del Controllo Positivo e Negativo seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare il tubo di BCR-ABL P210 - ELITE Positive Control per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 2 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
2. Trasferire almeno 80 µL di acqua ultrapura per biologia molecolare in una provetta di eluizione, fornita con ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
3. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".

4. Anche se non verrà effettuata alcuna estrazione, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
5. Selezionare nel Track di interesse, il protocollo del test da utilizzare nella colonna "Assay".
6. Selezionare BCR-ABL P210 ELITE\_PC per il controllo positivo e compilare il numero di lotto e la data di scadenza per BCR-ABL P210 Positive Control (Controllo Positivo),
7. Selezionare BCR-ABL P210 ELITE\_NC e compilare il numero di lotto e la data di scadenza per l'acqua ultrapura per biologia molecolare.
8. Fare clic su "Next" per continuare l'operazione successiva.
9. Caricare le **miscele complete di reazione** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare le "PCR Cassette", il BCR-ABL P210 Positive Control e il tubo di controllo negativo seguendo le istruzioni GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Chiudere la porta dello strumento,
13. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'**ELITE InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

**Nota bene:** Alla fine della corsa il **BCR-ABL P210 Positive Control** rimasto deve essere rimosso dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 °C. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

**Nota bene:** Alla fine della corsa le "PCR Cassette", con i prodotti di reazione e i consumabili, devono essere rimosse dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

**Nota bene:** Alla fine della corsa le **miscele complete di reazione** possono essere conservate a bordo nel blocco refrigerato, tenendo conto del tempo massimo di 5 ore totali.

### Esame e approvazione dei risultati

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display". In questa schermata sono visualizzati i risultati relativi a campione / calibratore / controllo e le informazioni relative alla corsa. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i rapporti ("Sample Report" o "Track Report"). Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

**Nota bene:** il sistema **ELITE InGenius** può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile inviare le informazioni di impostazione della sessione. Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

**ELITE InGenius** genera i risultati con « **BCR-ABL P210 ELITE MGB® Kit** » attraverso questa procedura:

- A. Validazione della curva di calibrazione
- B. Validazione dei risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo
- C. Validazione dei risultati del campione
- D. Refertazione dei risultati del campione

**A. Validazione della curva di calibrazione**

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda specifica per P210 (Channel 1 "P210") nelle reazioni di amplificazione del calibratore sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nel protocollo del saggio "BCR-ABL ELITE\_STD\_P210".

al segnali di fluorescenza emessi dalla sonda specifica per ABL (Channel 1 "ABL") nelle reazioni di amplificazione del calibratore sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nel protocollo del saggio "BCR-ABL ELITE\_STD\_ABL".

Le curve di calibrazione P210 e ABL, specifiche per il lotto del reagente di amplificazione, sono memorizzate nel database (Calibration) dopo l'approvazione da parte del personale con la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni GUI.

Le curve di calibrazione, specifiche per il lotto del reagente di amplificazione, scadranno **dopo 60 giorni**.

**Nota bene:** Quando la curva di calibrazione non soddisfa i criteri di accettazione, lo strumento visualizza il messaggio "Failed" nella schermata "Calibration" e non è possibile approvarla. Le reazioni di amplificazione del calibratore devono essere ripetute.

**Nota Bene:** Nel caso in cui la curva di calibrazione sia caricata insieme ai campioni ed il risultato non sia valido, l'intera sessione non sarà valida e l'amplificazione di tutti i campioni dovrà essere ripetuta.

**B. Validazione dei risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo**

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda specifica per P210 (Channel 1 "P210") nelle reazioni di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nel protocollo del saggio "BCR-ABL P210 ELITE\_PC" e "BCR-ABL P210 ELITE\_NC".

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, sono memorizzati nel database (Controls) dopo l'approvazione da parte del personale con la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni GUI.

I risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, scadono **dopo 15 giorni**.

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo sono utilizzati dal software dello strumento per calcolare e impostare la carta di controllo. Quattro (4) valori controllo, da 4 sedute diverse sono richiesti per impostare la carta di controllo. Dopo di che, i valori del Controllo Positivo e del Controllo Negativo sono utilizzati per monitorare la fase di amplificazione. Fare riferimento al manuale d'uso dello strumento per ulteriori dettagli.

**Nota Bene:** Quando un risultato dell'amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, lo strumento visualizza il messaggio "Failed" nella schermata "Controls" e non è possibile approvarlo. In questo caso la reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo deve essere ripetuta.

**Nota Bene:** Se il Controllo Positivo o il Controllo Negativo è processato insieme con i campioni da analizzare ed il risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In questo caso anche l'amplificazione dei campioni deve essere ripetuta.

**C. Validazione dei risultati del campione**

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda specifica per P210 (Channel 1 "P210") e dalla sonda specifica per ABL (Channel 1 "ABL"), in ogni reazione di amplificazione sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nel protocollo del saggio BCR-ABL P210\_PBL\_200\_100.

I risultati sono descritti nei rapporti generati dallo strumento ("Result Display").

La corsa del campione è valida quando le tre condizioni riportate nella tabella sottostante sono soddisfatte.

<b>1) Curva di calibrazione</b>	<b>Status</b>
BCR-ABL P210 Q-PCR Standard	APPROVED
<b>2) Controllo Positivo</b>	<b>Status</b>
BCR-ABL P210 Positive Control	APPROVED
<b>3) Controllo Negativo</b>	<b>Status</b>
BCR-ABL P210 Negative Control	APPROVED

Per ciascun campione il risultato del saggio è interpretato automaticamente dal sistema come stabilito dall'algoritmo dell'**ELITE InGenius software** e dai parametri del protocollo del saggio.

Nella reazione di amplificazione di ogni campione, i valori di **Ct P210** sono utilizzati per rilevare e quantificare la presenza del mRNA target, mentre i valori di **Ct ABL** sono utilizzati per rilevare e quantificare la presenza del mRNA di controllo (validazione dell'estrazione e normalizzazione del target).

I valori di **Ct P210** e **Ct ABL** nella reazione di amplificazione di ogni campione e delle **Curve Standard** sono utilizzati per calcolare la **quantità di mRNA** di P210 e ABL nelle reazioni di amplificazione dei campioni. Le **quantità di mRNA** di P210 e ABL sono poi utilizzate per calcolare la percentuale di copie di p210 mRNA normalizzata rispetto alle copie di ABL mRNA (**%P210**).

I possibili messaggi relativi al risultato di un campione sono riportati nella tabella sottostante.

<b>Risultato della corsa del campione</b>	<b>Interpretazione</b>
P210:percentage is x.xxxx%	<b>P210 RNA rilevato.</b> La %P210 calcolata è riportata.
P210:percentage is 0.0000%	<b>P210 RNA non rilevato o è al di sotto del Limit of Detection</b> del protocollo. Equivalente a %P210 = 0%.
Inconclusive - Retest Sample	<b>P210 RNA rilevato ma la %P210 non può essere calcolata.</b> La differenza tra le quantità dei duplicati di P210 non è accettabile. Ripetere il campione.
Invalid - Retest Sample	<b>ABL RNA è al di sotto del Cut-off (10,000 copie).</b> Ripetere il campione.

Per completare le informazioni relative a ogni campione analizzato, i risultati di ogni singola reazione (Tracks) per P210 e ABL sono riportati come nella tabella sottostante.

<b>Risultato del singolo replicato</b>	<b>Interpretazione</b>
P210: RNA Detected, quantity equal to xxx copies/reaction	<b>P210 RNA rilevato.</b> La quantità di mRNA di P210 calcolata è riportata.
P210: RNA Not detected or below the LoD	<b>P210 RNA non rilevato o è al di sotto del Limit of Detection</b> del protocollo.
ABL: RNA Detected, quantity equal to xxx copies/reaction	<b>ABL RNA rilevato.</b> La quantità di mRNA di ABL calcolata è riportata.
ABL: RNA Not detected or below the LoD	<b>ABL RNA non rilevato o è al di sotto del Limit of Detection</b> del protocollo.

La tabella sottostante riporta i possibili casi che possono presentarsi in una sessione di amplificazione e l'approccio utilizzato per generare i messaggi relativi al risultato.

Campione	P210 (copie/reazione)	ABL (copie/reazione)	Risultato del campione (%P210)	Interpretazione
1° replicato	Quantità	Quantità ≥ 10,000	P210 percentage is x.xxxx%	P210 RNA rilevato. Quantità di mRNA di P210 calcolata è riportata.
2° replicato	Quantità	Quantità ≥ 10,000		
1° replicato	Non Rilevato	Quantità ≥ 10,000	P210 RNA Not Detected or below the LoD	P210 RNA non rilevato o è al di sotto del Limit of Detection del protocollo. Equivalente a %P210 = 0%
2° replicato	Non Rilevato	Quantità ≥ 10,000		
1° replicato	Quantità < 10 copie	Quantità ≥ 10,000	P210 percentage is x.xxxx %	P210 RNA rilevato. Quantità di mRNA di P210 calcolata è riportata.
2° replicato	Non Rilevato	Quantità ≥ 10,000		
1° replicato	Quantità > 10 copie	Quantità ≥ 10,000	Inconclusive-Retest Sample	P210 RNA rilevato ma la %P210 non può essere calcolata. La differenza tra le quantità dei duplicati di P210 non è accettabile. Ripetere il campione.
2° replicato	Non Rilevato	Quantità ≥ 10,000		
1° replicato	Rilevato O Non Rilevato	Quantità < 10,000	Invalid-Retest Sample	ABL RNA è al di sotto del Cut-off (10,000 copie). Ripetere il campione.
2° replicato	Rilevato O Non Rilevato	Quantità ≥ 10,000		
1° replicato	Rilevato O Non Rilevato	Quantità < 10,000	Invalid-Retest Sample	ABL RNA è al di sotto del Cut-off (10,000 copie). Ripetere il campione.
2° replicato	Rilevato O Non Rilevato	Quantità < 10,000		

**Nota bene:** se per un campione il risultato ottenuto per la reazione di amplificazione di P210 è < 3 copie/reazione, la quantità verrà riportata a 3 copie/reazione.

I campioni riportati come "Invalid - Retest Sample" dal software ELITE InGenius non sono idonei per l'interpretazione dei risultati, dato che non è stato possibile rilevare in modo efficiente il mRNA di ABL perché si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o nella fase di estrazione (degradazione del RNA, perdita del RNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'estratto, vedi PROBLEMI E SOLUZIONI), che possono causare risultati errati e falsi negativi. Il campione non è idoneo per il calcolo della %P210. Quando il volume dell'eluato è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato mediante amplificazione in modalità "PCR Only". Se si conferma il risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota utilizzando la modalità "Extract + PCR".

I campioni riportati come "Inconclusive-Retest Sample" dal software ELITE InGenius non sono idonei per l'interpretazione dei risultati, dato che non è stato possibile rilevare in modo efficiente il mRNA di P210 perché si sono verificati problemi nella fase di estrazione (degradazione del RNA, perdita del RNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'estratto, vedi PROBLEMI E SOLUZIONI), che possono causare risultati errati e falsi negativi. Il campione non è idoneo per il calcolo della %P210. Quando il volume dell'eluato è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato mediante amplificazione in modalità "PCR Only". Se si conferma il risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota utilizzando la modalità "Extract + PCR".

I campioni idonei in cui non è stato possibile rilevare il RNA di P210 sono segnalati come "P210 RNA Not Detected or below LoD". In questo caso non si può escludere che il RNA di P210 sia presente ad un titolo inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni").

**Nota bene:** I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e gli altri risultati degli esami di laboratorio relativi al paziente.

I risultati della corsa del campione sono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Result Display) da parte di personale con la qualifica di "Administrator" o "Analyst" seguendo le istruzioni della GUI. Dalla finestra "Result Display" è possibile stampare e salvare i risultati della sessione come "Sample Report" e "Track Report".

#### D. Refertazione dei risultati del campione

I risultati del campione sono memorizzati nel database e possono essere esportati come "Sample Report" e "Track Report".

Il "Sample Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per i campioni selezionati (SID).

Il "Track Report" mostra i dettagli di una Sessione di lavoro per i "Track" selezionati.

I "Sample Report" e "Track Report" possono essere stampati e firmati dal personale autorizzato.

### CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

#### Sensibilità analitica: limite di rilevazione

La sensibilità analitica di questo saggio, come limite di rilevazione di RNA totale, è stata verificata utilizzando il materiale di riferimento calibrato IVS10011 Clonal Control RNA (InVivoScribe, US), RNA totale estratto da linea cellulare umana positiva per BCR-ABL P210 b3a2 diluita in RNA totale da linea cellulare umana negativa per la traslocazione. La diluizione 10<sup>-5</sup> è stata testata in 20 replicati (300 ng di RNA/reazione), eseguendo l'intera procedura di trascrizione inversa e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. in associazione con il sistema ELITE InGenius.

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Limite di rilevazione con campioni di RNA totale e ELITE InGenius					
Campioni	Diluizione	N	Positivi	Negativi	P210%
P210 RNA	10 <sup>-5</sup>	20	20	0	0.0025%

Tutti i replicati sono risultati positivi per P210, con una concentrazione media di P210% di 0.0025%. La quantità media di ABL registrata nel corso dei test è stata 100.000 copie / reazione.

#### Intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare di questo saggio con RNA totale è stata verificata utilizzando il materiale di riferimento calibrato IVS10011 Clonal Control RNA (InVivoScribe, US). Il pannello consiste di RNA totale estratto da linea cellulare umana positiva per BCR-ABL P210 b3a2 diluita in RNA totale da linea cellulare umana negativa per la traslocazione. Le diluizioni utilizzate andavano dal puro P210 RNA positivo (P210 RNA) al 10<sup>-5</sup> (diluizioni di 1 Log). Ogni campione del pannello è stato testato in 4 replicati (300 ng di RNA / reaction), eseguendo l'intera procedura di trascrizione inversa e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. in associazione con il sistema ELITE InGenius. L'analisi statistica è stata effettuata tramite regressione lineare.

L'analisi dei dati ottenuti ha dimostrato che il saggio presenta una risposta lineare per i punti del pannello dal puro P210 RNA positivo al 10<sup>-5</sup> con una correlazione lineare maggiore di 0.99.

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato alla più alta concentrazione testata che è il puro P210 RNA positivo, corrispondente alla concentrazione di P210% del 100%.

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare verificato in questo test è la diluizione 10<sup>-5</sup>, equivalente al Limit of Detection e corrispondente alla concentrazione di P210% dello 0.0025%.

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare con campioni di RNA totale e ELITE InGenius			
Campione	Media P210 copie/reazione	Media P210 Log copie/reazione	Dev Std
P210 RNA	474,505	5.676	0.02
diluizione 10 <sup>-1.0</sup>	37,516	4.574	0.02
diluizione 10 <sup>-2.0</sup>	3,545	3.549	0.02
diluizione 10 <sup>-3.0</sup>	308	2.484	0.07
diluizione 10 <sup>-4.0</sup>	36	1.553	0.06
diluizione 10 <sup>-5.0</sup>	3	0.365	0.33

La quantità media di ABL registrata nel corso dei test è stata 150.000 copie / reazione

**BCR-ABL P210 ELITE MGB® Kit**

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e l'amplificazione Real Time del cDNA

REF RTSG07PLD210

**Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi**

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata eseguendo l'analisi di un pannello di campioni positivi per P210.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando 33 campioni di sangue periferico fresco raccolto in EDTA da pazienti affetti da leucemia, testati positivi per la traslocazione BCR-ABL, variante P210, con un prodotto CE IVD di amplificazione real time. Ogni campione è stato testato con il sistema **ELITE InGenius** in modalità "Extract + PCR".

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente:

Campioni	N	positivi	negativi	non validi
Campioni di sangue periferico positivo per P210	33	32	1	0

In questo test, 32 campioni su 33 sono stati confermati positivi, un campione è risultato discrepante negativo. In questo test la sensibilità diagnostica del saggio è risultata uguale al 97%.

La quantità media di ABL registrata nel corso dei test è stata 60.000 copie / reazione.

**Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi**

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata eseguendo l'analisi di un pannello di campioni negativi per P210.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando 41 campioni di sangue periferico fresco raccolto in EDTA da diversi soggetti testati negativi per la traslocazione BCR-ABL, variante P210, con un prodotto CE IVD di amplificazione real time. Ogni campione è stato testato con il sistema **ELITE InGenius** in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono riportati nella tabella seguente:

Campioni	N	positivi	negativi	non validi
Campioni di sangue periferico negativo per P210	41	2	39	0

In questo test, 39 campioni su 41 sono stati confermati negativi, due campioni sono risultati discrepanti negativi. In questo test la specificità diagnostica del saggio è risultata uguale al 95,1%.

La quantità media di ABL registrata nel corso dei test è stata 50.000 copie / reazione.

**Nota bene:** I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto "BCR-ABL P210 ELITE MGB® Kit", FTP G07PLD210.

**BCR-ABL P210 ELITE MGB® Kit**

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e l'amplificazione Real Time del cDNA

REF RTSG07PLD210

**ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument  
ABI 7300 Real-Time System****CAMPIONI E CONTROLLI****Campioni**

Questo prodotto deve essere utilizzato con **RNA estratto** di sospensioni di linfomonociti e sospensioni di leucociti da campioni clinici di sangue periferico o sangue midollare.

Questo prodotto può essere utilizzato aggiungendo da 300 ng fino a 1,5 µg di **RNA estratto** alla reazione di trascrizione inversa e amplificazione real time.

Sospensioni di linfomonociti e sospensioni di leucociti.

I campioni di sospensioni di linfomonociti o di leucociti (per esempio da buffy coat) destinati all'estrazione dell'RNA devono essere preparati a partire da campioni clinici di sangue periferico o sangue midollare secondo le indicazioni del laboratorio, risospesi in soluzione fisiologica sterile o PBS sterile, contati e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di quattro ore.

La quantità ottimale di leucociti da cui estrarre l'RNA totale è di circa 10.000.000 di cellule.

Non congelare le sospensioni di linfomonociti o di leucociti in modo da evitare la degradazione dell'RNA.

Quando si parte da sangue periferico o midollare è consigliabile eseguire la separazione dei leucociti o dei linfomonociti secondo le indicazioni del laboratorio.

Il sangue periferico raccolto in EDTA o citrato o sangue midollare raccolto in EDTA o citrato destinati alla preparazione di linfomonociti o di leucociti devono essere prelevati secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di quattro ore.

Non congelare il sangue periferico o sangue midollare in modo da evitare la degradazione dell'RNA.

**Sostanze interferenti**

L'RNA estratto dal campione di partenza non deve contenere eparina, emoglobina, destrano, Ficoll®, etanolo o propan-2-olo per evitare fenomeni di inibizione e la comparsa di frequenti risultati non validi.

Quantità di RNA estratto superiori a 1,5 µg per reazione possono inibire la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione real time.

Quantità di DNA genomico umano superiori a 100 ng per reazione presenti nell'RNA estratto dal campione possono interferire o inibire la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione real time.

Non sono disponibili dati riguardo eventuali fenomeni di inibizione da parte di farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori.

**Controlli di amplificazione**

È assolutamente necessario convalidare ciascuna sessione di amplificazione allestendo una reazione per il controllo negativo e una reazione per il controllo positivo.

Per il controllo negativo utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita nel prodotto) da aggiungere alla reazione al posto dell'RNA estratto dal campione.

Per il controllo positivo utilizzare il prodotto «**BCR-ABL P210 ELITE Standard**».

**Controlli di qualità**

È consigliato convalidare l'intera procedura di analisi di ciascuna sessione, estrazione, trascrizione inversa ed amplificazione, utilizzando un campione negativo e un campione positivo già testati oppure del materiale di riferimento calibrato.



Riferendosi alla documentazione dello strumento, impostare sul software dedicato (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del **ciclo termico**:

- aggiungere nella fase di amplificazione il passaggio (Add Step) di **estensione a 72 °C**;

**Nota bene:** l'acquisizione della fluorescenza (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) deve rimanere impostata nel passaggio di **ibridazione a 56 °C**.

- modificare i tempi come indicato nella tabella "Ciclo termico";
- impostare un numero di cicli pari a **45**;
- impostare un volume di reazione pari a **30 µL**.

Ciclo termico		
Fase	Temperature	Tempi
Retrotrascrizione	50 °C	20 min.
Denaturazione iniziale	94 °C	5 min.
Amplificazione e rilevazione (45 cicli)	94 °C	10 sec.
	56 °C (acquisizione della fluorescenza)	30 sec.
	72 °C	15 sec.

#### Allestimento dell'amplificazione real time

(Da eseguire nell'area di estrazione / allestimento della reazione di amplificazione)

Prima di iniziare la sessione è necessario:

- verificare la disponibilità dei reagenti richiesti per i campioni da analizzare (vedi tabella a pag. 10).
- prelevare e scongelare a temperatura ambiente (+18 / 25 °C) le provette con i campioni di RNA da analizzare. Agitare con vortex 5 secondi le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in un blocco freddo;
- prelevare e scongelare per 30 minuti a temperatura ambiente (+18 / 25 °C) le provette di **P210 PreMix** (tappo BIANCO) e **ABL PreMix** (tappo NEUTRO) necessarie per la sessione ricordando che il contenuto di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **50 reazioni**. Agitare con vortex per 10 secondi per tre volte le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in un blocco freddo;
- prelevare e scongelare per 30 minuti a temperatura ambiente (+18 / 25 °C) le provette di **PCR MasterMix** (tappo NEUTRO) necessarie per la sessione ricordando che il contenuto di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **50 reazioni**. Agitare con vortex per 10 secondi per tre volte le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in un blocco freddo;
- prelevare al momento dell'uso le provette di **RT EnzymeMix** (tappo NERO) necessarie per la sessione ricordando che il contenuto di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **50 reazioni**. Centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in un blocco freddo.

**Nota bene:** L' **RT EnzymeMix** non deve rimanere esposto a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti.

- prelevare e scongelare per 30 minuti a temperatura ambiente (+18 / 25 °C) le provette di **P210-ABL Q-PCR Standard** necessarie per la sessione (**reazioni sia per P210 sia per ABL**) ricordando che il contenuto di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **12 reazioni**. Agitare le provette con vortex per 10 secondi, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in un blocco freddo;
- prelevare l'**Amplification microplate** che sarà utilizzata nella sessione facendo attenzione a maneggiarla con guanti senza polvere e a non danneggiare i pozzetti;
- prelevare l'**Amplification Sealing Sheet** che sarà utilizzato nella sessione facendo attenzione a maneggiarlo con guanti senza polvere e a non danneggiarlo;
- preparare due microprovette per biologia molecolare in polipropilene da 1,5 mL (non fornite nel kit): una per la miscela completa di reazione **P210** e l'altra per la miscela completa di reazione **ABL** e marcarle in modo riconoscibile con un pennarello indelebile;

- preparare le due miscele complete di reazione, una per **P210** e l'altra per **ABL**, con i tre componenti forniti nel prodotto in base al numero di campioni da analizzare come descritto nella tabella presentata di seguito.

**Nota bene:** Per una singola reazione di trascrizione inversa e amplificazione real time sono necessari 5 µL di PreMix, 15 µL di PCR MasterMix e 0,3 µL di RT EnzymeMix. I volumi indicati nella tabella sono sufficienti per l'allestimento delle reazioni di trascrizione inversa e amplificazione real time richieste per i campioni da analizzare, il controllo negativo, i Q - PCR Standard, tutti in duplicato, più un adeguato margine di sicurezza.

Numero dei campioni da analizzare	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

Mescolare le due miscele complete di reazione con vortex per 10 secondi per tre volte, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in un blocco freddo.

**Nota bene:** Le miscele complete di reazione preparate devono essere utilizzate entro 1 ora. Le miscele di reazione preparate **non** possono essere conservate.

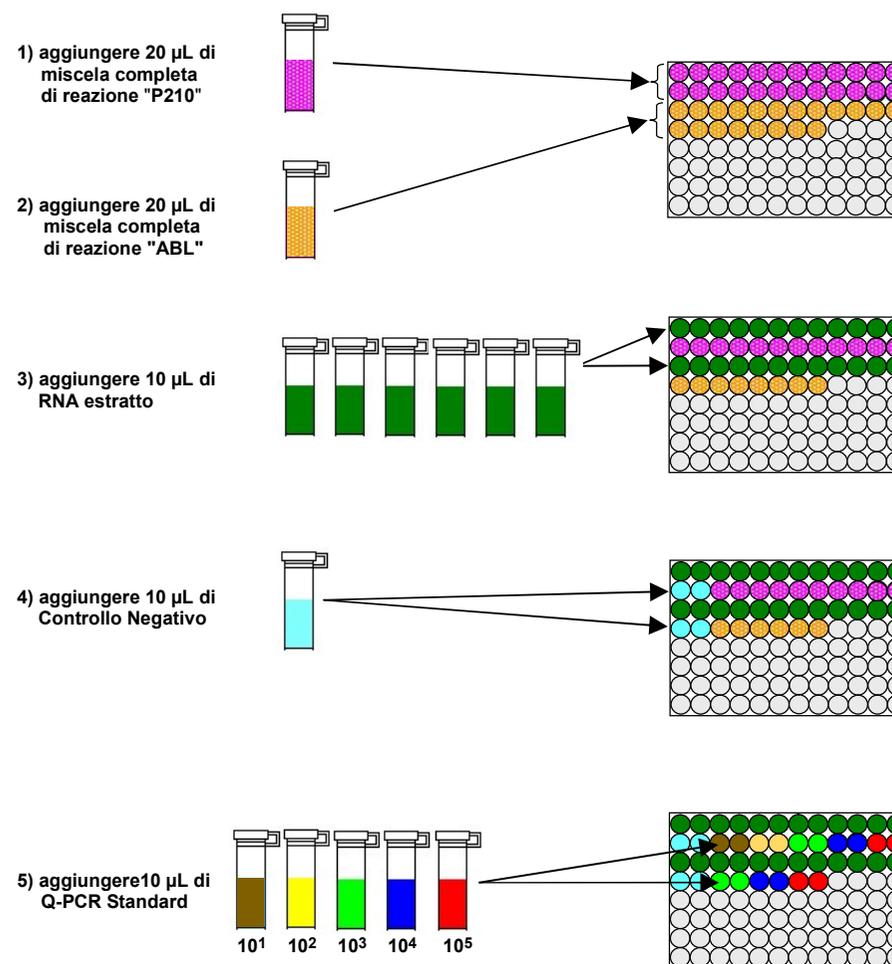
Allestire le **reazioni per P210 e per ABL** come descritto di seguito avendo cura di tenere l'**Amplification microplate** in un blocco freddo (~+5 °C).

1. Trasferire, depositandoli accuratamente sul fondo senza creare bolle, **20 µL di miscela completa di reazione "P210"** nei pozzetti "P210" dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**.
2. Trasferire, depositandoli accuratamente sul fondo senza creare bolle, **20 µL di miscela completa di reazione "ABL"** nei pozzetti "ABL" dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**.
3. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela completa di reazione, **10 µL di RNA estratto** del primo campione nei corrispondenti due pozzetti "P210" e nei due pozzetti "ABL" dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare energicamente il campione pipettando per tre volte l'**RNA estratto** nella miscela completa di reazione. Fare attenzione a non creare bolle sia sul fondo del pozzetto sia in superficie. Procedere allo stesso modo con tutti gli altri **RNA estratti**.
4. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela completa di reazione, **10 µL di Acqua per biologia molecolare** (non fornita nel prodotto) nei due pozzetti "P210" e nei due pozzetti "ABL" dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare energicamente il controllo negativo pipettando per tre volte l'**Acqua per biologia molecolare** nella miscela completa di reazione. Fare attenzione a non creare bolle sia sul fondo del pozzetto sia in superficie.

5. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela completa di reazione, **10 µL** del primo **P210-ABL Q-PCR Standard** nei corrispondenti due pozzetti "P210" dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare energicamente lo standard pipettando per tre volte il **P210-ABL Q-PCR Standard** nella miscela completa di reazione. Fare attenzione a non creare bolle sia sul fondo del pozzetto sia in superficie. Procedere allo stesso modo con gli altri **P210-ABL Q-PCR Standard**.
6. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela completa di reazione, **10 µL** del primo **P210-ABL Q-PCR Standard** nei corrispondenti due pozzetti "ABL" dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare energicamente lo standard pipettando per tre volte il **P210-ABL Q-PCR Standard** nella miscela completa di reazione. Fare attenzione a non creare bolle sia sul fondo del pozzetto sia in superficie. Procedere allo stesso modo con gli altri **P210-ABL Q-PCR Standard**.
7. Sigillare accuratamente l'**Amplification microplate** con l'**Amplification Sealing Sheet**.
8. Trasferire l'**Amplification microplate** nel thermal - cycler per real time nell'area di amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione ed avviare il ciclo termico di amplificazione salvando l'impostazione della sessione con un identificativo univoco e riconoscibile (per esempio. "anno-mese-giorno-BCR-ABL-P210-EGSpA").

**Nota bene:** Al termine del ciclo termico l'**Amplification microplate** con i prodotti di reazione deve essere rimossa dallo strumento ed eliminata in modo da non generare contaminazioni ambientali. **Non sollevare mai l'Amplification Sealing Sheet dall'Amplification microplate** in modo da evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

Nella figura di seguito è illustrata in sintesi la procedura di allestimento delle reazioni di trascrizione inversa e amplificazione real time per P210 e ABL.



#### Analisi dei risultati

I valori registrati della fluorescenza emessa dalla sonda specifica per P210 (detector FAM "P210") e dalla sonda specifica per il ABL (detector FAM "ABL") nelle reazioni di amplificazione devono essere analizzati dal software dello strumento.

Prima di eseguire l'analisi, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:  
- impostare manualmente (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) l'intervallo di calcolo del **Livello di fluorescenza di fondo (Baseline)** dal ciclo 6 al ciclo 15;

**Nota bene:** Nel caso di un campione positivo ad alto titolo per P210 o ABL, la fluorescenza FAM delle reazioni di amplificazione P210 e ABL può cominciare a crescere prima del ciclo 15. In questo caso l'intervallo di calcolo del **Livello di fluorescenza di fondo** deve essere adattato, per entrambi i detector, dal ciclo 6 al ciclo in cui la fluorescenza FAM comincia a crescere come rilevato dal software dello strumento (Results > Component).

- impostare manualmente la **Soglia (Threshold)** per il detector FAM "P210" a **0,1**;
- impostare manualmente la **Soglia (Threshold)** per il detector FAM "ABL" a **0,1**.

I valori di fluorescenza emessi dalle sonde specifiche nella reazione di amplificazione e la **Soglia** di fluorescenza sono utilizzati per determinare il **Ciclo Soglia (Ct, Threshold cycle)**, cioè il ciclo in cui è stato raggiunto il valore **Soglia** di fluorescenza.

#### Curva standard

Nelle reazioni di amplificazione P210 e ABL con i **Q - PCR Standard**, i valori di **Ct** per **P210** e per **ABL** sono utilizzati per calcolare le due **Curve standard** (Results > Standard Curve) della sessione di amplificazione e per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Reazione P210 - Q - PCR Standard 10 <sup>5</sup> detector FAM "P210"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
<b>Ct ≤ 25</b>	<b>POSITIVO</b>	<b>CORRETTA</b>

Reazione P210 - Curva Standard detector FAM "P210"	Intervallo di accettabilità*	Amplificazione / Rilevazione
<b>Coefficiente di Determinazione (R2)</b>	<b>0,970 ≤ R2 ≤ 1,000</b>	<b>CORRETTA</b>

Reazione ABL - Q - PCR Standard 10 <sup>5</sup> detector FAM "ABL"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
<b>Ct ≤ 25</b>	<b>POSITIVO</b>	<b>CORRETTA</b>

Reazione ABL - Curva Standard detector FAM "ABL"	Intervallo di accettabilità	Amplificazione / Rilevazione
<b>Coefficiente di Determinazione (R2)</b>	<b>0,990 ≤ R2 ≤ 1,000</b>	<b>CORRETTA</b>

\* **Nota bene:** Se la curva standard per P210 è stata allestita omettendo il punto di diluizione Q - PCR Standard 10<sup>1</sup> copie / reazione l'intervallo di accettabilità del Coefficiente di Determinazione sarà 0,990 ≤ R2 ≤ 1,000.

Se il risultato delle reazioni di amplificazione del **Q - PCR Standard 10<sup>5</sup>** è **Ct > 25** o **Ct Non determinato (Undetermined)** o se il valore del **Coefficiente di Determinazione (R2)** non rientra nei limiti, non è stata rilevata in modo corretto la presenza di DNA target. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o di rilevazione (preparazione errata della miscela completa di reazione, dispensazione errata della miscela completa di reazione o degli standard, degradazione della sonda o degli standard, impostazione errata della posizione degli standard, impostazione errata del ciclo termico, vedi Problemi e Soluzioni) che possono causare risultati errati. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

#### Controllo negativo

Nelle reazioni di amplificazione P210 e ABL con il **Controllo negativo**, i valori di **Ct** per **P210** e per **ABL** (Results > Report) sono utilizzati per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Reazione P210 - Controllo negativo detector FAM "P210"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
<b>Ct Non determinato</b>	<b>NEGATIVO</b>	<b>CORRETTA</b>

Reazione ABL - Controllo negativo detector FAM "ABL"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
<b>Ct Non determinato</b>	<b>NEGATIVO</b>	<b>CORRETTA</b>

Se il risultato delle reazioni di amplificazione del **Controllo negativo** è diverso da **Ct Non determinato** per P210 e per ABL, è stata rilevata la presenza di DNA target. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (contaminazione, errore nella preparazione della miscela completa di reazione, degradazione della sonda, errore nella dispensazione della micropiastre, errore durante l'impostazione dello strumento, vedi Problemi e Soluzioni) che possono causare risultati non corretti e falsi positivi. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

#### Campioni

Nelle reazioni di amplificazione di ciascun **campione**, i valori di **Ct P210** sono utilizzati per rilevare e quantificare la presenza dell'mRNA target, mentre i valori di **Ct ABL** sono utilizzati per rilevare e quantificare la presenza dell'mRNA di controllo (normalizzatore e controllo per convalidare dell'estrazione).

**Nota bene:** Verificare con il software dello strumento (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) che il **Ct** sia determinato da un rapido e regolare incremento dei valori di fluorescenza e non da fenomeni di picco o incremento graduale del segnale di fondo (fondo irregolare o elevato).

I valori di **Ct P210** e di **Ct ABL** nelle reazioni di amplificazione di ciascun **campione** e le **Curve standard** della sessione di amplificazione sono utilizzati per calcolare la **Quantità ottenuta di mRNA (Quantity)** di P210 e di ABL presente nelle reazioni di amplificazione relative ai campioni.

Reazioni del campione		
Detector FAM	mRNA	Quantità ottenuta di mRNA
<b>Ct determinato</b>	<b>RILEVATO</b>	<b>Quantity</b>
<b>Ct Non determinato</b>	<b>NON RILEVATO</b>	<b>0</b>

I risultati come **Quantità** delle reazioni di amplificazione **P210** e **ABL** ottenuti nei duplicati di ciascun **campione** (Results > Report) sono analizzati come descritto nella tabella seguente che riporta i diversi casi che si possono verificare in una sessione di amplificazione e le modalità di valutazione.

Campione	mRNA di P210	mRNA di ABL*	Quantità calcolata di mRNA di P210	Quantità calcolata di mRNA di ABL
1° replicato	RILEVATO	Quantità ≥ 10.000	somma delle Quantità ottenute	somma delle Quantità ottenute
2° replicato	RILEVATO	Quantità ≥ 10.000		
1° replicato	NON RILEVATO	Quantità ≥ 10.000	0	somma delle Quantità ottenute
2° replicato	NON RILEVATO	Quantità ≥ 10.000		
1° replicato	Quantità < 10 copie	Quantità ≥ 10.000	Quantità ottenuta	somma delle Quantità ottenute
2° replicato	NON RILEVATO	Quantità ≥ 10.000		
1° replicato	Quantità > 10 copie	Quantità ≥ 10.000	Ripetere l'analisi del campione	
2° replicato	NON RILEVATO	Quantità ≥ 10.000		
1° replicato	RILEVATO o NON RILEVATO	Quantità <10.000	Ripetere l'analisi del campione	
2° replicato	RILEVATO o NON RILEVATO	Quantità ≥ 10.000		
1° replicato	RILEVATO o NON RILEVATO	Quantità <10.000	Ripetere l'analisi del campione	
2° replicato	RILEVATO o NON RILEVATO	Quantità <10.000		

**\*Nota bene:** Se il risultato delle reazioni di amplificazione **ABL** di un campione è **Quantità ABL < 10.000** o **ABL NON RILEVATO**, per almeno uno dei due replicati, non è stato possibile rilevare in modo efficiente l'mRNA di ABL. In questo caso si possono essere verificati problemi nella fase di estrazione (perdita dell'RNA, presenza di inibitori, RNA estratto degradato, vedi Problemi e Soluzioni) che possono causare risultati errati e falsi negativi.

**Nota bene:** Quando per un campione il risultato delle reazioni di amplificazione è **P210 NON RILEVATO** e **Quantità ABL < 10.000** o **ABL NON RILEVATO** per almeno uno dei due replicati, il risultato del saggio è non valido e il campione non è idoneo. L'analisi deve essere ripetuta prima sull'RNA estratto e, in caso di conferma del problema, a partire dall'estrazione di un nuovo campione del paziente.

**Nota bene:** Se il risultato delle reazioni di amplificazione di un campione è **P210 RILEVATO** e **Quantità ABL < 10.000** o **ABL NON RILEVATO** per almeno uno dei due replicati, il risultato del saggio è valido e il campione è positivo per l'mRNA di P210. In questo caso comunque non può essere effettuata l'analisi quantitativa. L'analisi deve essere ripetuta prima sull'RNA estratto e, in caso di conferma del problema, a partire dall'estrazione di un nuovo campione del paziente.

**Nota bene:** Quando per un campione il risultato delle reazioni di amplificazione è **P210 NON RILEVATO** e **Quantità ABL ≥ 10.000** per entrambi i replicati, il campione non è positivo per l'mRNA di P210 ma non si può escludere che l'mRNA di P210 sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi paragrafo sulle Caratteristiche delle Prestazioni). In questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

**Nota bene:** Se il risultato delle reazioni di amplificazione di un campione è **Quantità P210 ≥ 10 copie** per un replicato e **P210 NON RILEVATO** per l'altro replicato e **Quantità ABL ≥ 10.000** per entrambi i replicati, l'mRNA di P210 non è stato identificato in modo corretto nell'RNA estratto dal campione. Il risultato del saggio è valido e il campione è positivo per l'mRNA di P210. In questo caso comunque non può essere effettuata l'analisi quantitativa. L'analisi deve essere ripetuta prima sull'RNA estratto e, in caso di conferma del problema, a partire dall'estrazione di un nuovo campione del paziente.

Quando per un campione il risultato delle reazioni di amplificazione è **P210 RILEVATO** e **Quantità ABL ≥ 10.000**, il risultato del saggio è valido, il campione è positivo per l'mRNA di P210 e può essere effettuata l'analisi quantitativa.

Le **Quantità calcolate di mRNA di P210** e di **ABL** di ciascun **campione** sono utilizzate per calcolare la percentuale di copie di mRNA di P210 rispetto alle copie totali dell'mRNA di ABL (**P210 %**) presenti secondo questa formula:

$$\text{P210 \%} = \frac{\text{Quantità calcolata di mRNA di P210}}{\text{Quantità calcolata di mRNA di ABL}} \times 100$$

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli altri esami di laboratorio relativi al paziente.

### CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

#### Limite di rilevazione

Il limite di rilevazione di P210 del saggio con RNA totale è stato determinato utilizzando un pannello di diluizioni preparato dal materiale di riferimento calibrato IVS10011 Clonal Control RNA (InVivoScribe, US). Il pannello consiste in RNA totale estratto da una linea cellulare umana positiva per BCR-ABL P210 b3a2 diluito in RNA totale da una linea cellulare umana negativa per la traslocazione. I campioni utilizzati vanno da una diluizione 10<sup>-3,5</sup> ad una diluizione 10<sup>-6</sup> con passaggi di 0,5 Log. Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 24 replicati (300 ng di RNA / reazione) per eseguire la retrotrascrizione e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A in associazione allo strumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument. L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la diluizione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è il 95%.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Limite di rilevazione con campioni di RNA totale			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
<b>95% positività</b>	0,0016% P210% (diluizione 10 <sup>-5,0</sup> )	(diluizione 10 <sup>-5,2</sup> )	(diluizione 10 <sup>-4,7</sup> )

Il limite di rilevazione è stato definito alla diluizione 10<sup>-5</sup> corrispondente ad una concentrazione di P210% uguale a 0,0016%. La quantità media di ABL registrata nelle prove per la definizione del limite di rilevazione è stata di circa 200.000 copie per reazione.

#### Intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare di P210 del saggio con RNA totale è stata determinata utilizzando un pannello di materiale di riferimento calibrato IVS10011 Clonal Control RNA (InVivoScribe, US). Il pannello consiste in RNA totale estratto da una linea cellulare umana positiva per BCR-ABL P210 b3a2 diluito in RNA totale da una linea cellulare umana negativa per la traslocazione. I campioni utilizzati vanno dall'RNA positivo per P210 non diluito (RNA P210) ad una diluizione 10<sup>-6</sup> con passaggi di 1 Log. Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 24 replicati (300 ng di RNA per reazione) per eseguire la retrotrascrizione e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A in associazione allo strumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument. L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione lineare.

L'analisi dei dati ottenuti ha dimostrato che il saggio presenta una risposta lineare a partire dall'RNA positivo per P210 non diluito fino alla diluizione 10<sup>-5</sup> del pannello con un coefficiente di correlazione lineare superiore a 0,99.

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare verificato in questo test è il punto con l'RNA positivo per P210 non diluito, corrispondente ad una concentrazione di P210% uguale a 82,5%.

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare verificato in questo test è la diluizione 10<sup>-5</sup>, coincidente con il limite di rilevazione che corrisponde ad una concentrazione di P210% uguale a 0,0016%.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Intervallo lineare di misurazione con campioni di RNA totale			
Campione	media copie P210 / reazione	media Log copie P210 /reazione	Dev Std
RNA P210	358276,92	5,55	0,04
diluzione 10 <sup>-1.0</sup>	40903,93	4,61	0,04
diluzione 10 <sup>-2.0</sup>	4150,86	3,62	0,04
diluzione 10 <sup>-3.0</sup>	520,36	2,71	0,07
diluzione 10 <sup>-4.0</sup>	59,02	1,76	0,11
diluzione 10 <sup>-5.0</sup>	4,81	0,58	0,32

La quantità media di ABL registrata nelle prove per la definizione dell'intervallo di lineare di misurazione è stata di circa 320.000 copie per reazione.

I valori delle misurazioni di P210 e di ABL sono stati verificati utilizzando il materiale di riferimento certificato europeo ERM®-AD623 (IRMM, Belgio). Il materiale consiste in un pannello di diluizioni (1 Log tra una diluizione e la successiva) di DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione P210 ed ABL, la cui concentrazione iniziale è stata stabilita con la metodica della digital PCR. I punti del pannello da 10<sup>6</sup> copie / µL a 10<sup>1</sup> copie / µL sono stati impiegati in 9 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. «BCR-ABL P210 ELITe MGB® Kit» e «BCR-ABL P210 ELITe Standard» in associazione allo strumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.

L'analisi dei dati, eseguita secondo le modalità suggerite dall'IRMM, ha dimostrato che le misurazioni del materiale di riferimento certificate ottenute con i prodotti ELITechGroup S.p.A. rientrano nell'incertezza di misurazione per le quantità che vanno da 10<sup>6</sup> copie / µL a 10<sup>1</sup> copie / µL (equivalenti a 10.000.000 copie per reazione e a 100 copie per reazione utilizzandone 10 µL per reazione) per P210 e da 10<sup>6</sup> copie / µL a 10<sup>2</sup> copie / µL (equivalenti a 10.000.000 copie per reazione e a 1000 copie per reazione utilizzandone 10 µL per reazione) per ABL.

I risultati finali sono riassunti nelle tabelle seguenti.

Allineamento delle misurazioni di P210 al materiale di riferimento europeo ERM®-AD623		
Copie / µL certificate	Copie / µL misurate	Deviazione Standard
1.080.000	1.268.750	193.866
108.000	113.273	109.67
10.300	11.375	1.899
1.020	1.021	93
104	106	20
10,0	9,1	1,3

Allineamento delle misurazioni di ABL al materiale di riferimento europeo ERM®-AD623		
Copie / µL certificate	Copie / µL misurate	Deviazione Standard
1.080.000	1.355.000	197.990
108.000	129.250	12.781
10.300	13.427	1.843
1.020	1.150	140
104	116	17

#### Efficienza di rilevazione e quantificazione su eventuali polimorfismi

La sensibilità analitica del saggio, come efficienza di rilevazione e quantificazione con eventuali polimorfismi, è stata valutata per confronto di sequenze con banche dati nucleotidiche.

L'esame delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco e delle sonde fluorescenti (P210 e ABL) sull'allineamento delle sequenze disponibili in banca dati dei geni umani P210 e ABL ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative.

#### Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata eseguendo l'analisi di un pannello di campioni positivi per P210.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando 49 campioni di RNA di archivio estratto da sangue periferico raccolto in EDTA ottenuti da pazienti affetti da leucemia testati positivi per P210 con un prodotto CE IVD di amplificazione real time. I campioni sono stati estratti con una metodica validata nel laboratorio di riferimento. L'RNA totale estratto (300 ng / reazione) è stato retrotrascritto e amplificato con i prodotti ELITechGroup S.p.A. sullo strumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente:

Campioni	N	positivi	negativi
RNA da sangue raccolto in EDTA positivo per P210	49	49	0

In questo test la sensibilità diagnostica è risultata uguale al 100%.

I risultati riguardanti le Qty di ABL per campioni sangue periferico o midollare sono tutti sopra alle 40.000 copie/reazione.

#### Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata eseguendo l'analisi di un pannello di campioni negativi per P210.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando 31 campioni di RNA di archivio estratto da sangue periferico raccolto in EDTA ottenuti da pazienti testati negativi per P210 con un prodotto CE IVD di amplificazione. I campioni sono stati estratti con una metodica validata nel laboratorio di riferimento. L'RNA totale estratto (300 ng / reazione) è stato retrotrascritto e amplificato con i prodotti ELITechGroup S.p.A. sullo strumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.

I risultati sono riportati nella tabella seguente:

Campioni	N	positivi	negativi
RNA da sangue raccolto in EDTA negativo per P210	31	0	31

In questo test la specificità diagnostica è risultata uguale al 100%.

I risultati riguardanti le Qty di ABL per campioni sangue periferico o midollare sono tutti sopra alle 20.000 copie/reazione.

**Nota bene:** I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto "BCR-ABL P210 ELITe MGB® Kit", FTP G07PLD210.

#### BIBLIOGRAFIA

- J. Gabert et al. (2003) *Leukemia* 17: 2318 - 2357  
 E. Beillard et al. (2003) *Leukemia* 17: 2474 - 2486  
 M. Bacarani et al. (2013) *Blood* 122: 872 - 884  
 N. C. Cross et al. (2015) *Leukemia* 29: 999 - 1003  
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30  
 F. Daraio et al. (2016) *Blood* 128: 5423

**LIMITI DELLA PROCEDURA**

Utilizzare con questo prodotto soltanto l'RNA estratto dai seguenti campioni clinici: da sospensioni di linfomonociti e leucociti da campioni clinici di sangue intero periferico o sangue midollare.

Non utilizzare con questo prodotto l'RNA estratto da campioni eparinati: l'eparina inibisce la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione degli acidi nucleici e causa risultati non validi.

Non utilizzare con questo prodotto RNA estratto contaminato da emoglobina, destrano, Ficoll®, etanolo o propan-2-olo: queste sostanze inibiscono la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione degli acidi nucleici e possono causare risultati non validi.

Quantità di RNA estratto superiori a 1,5 µg per reazione possono inibire la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione degli acidi nucleici.

Non utilizzare con questo prodotto RNA estratto contenente elevate quantità di DNA genomico umano che possono inibire la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione degli acidi nucleici e causare risultati non validi.

Non sono disponibili dati riguardo eventuali fenomeni di inibizione da parte di farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori.

I risultati ottenuti con questo prodotto dipendono dalla corretta identificazione, raccolta, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni; per evitare risultati errati è quindi necessario porre particolare cura durante queste fasi e seguire attentamente le istruzioni fornite con i prodotti per l'estrazione degli acidi nucleici.

La metodica di amplificazione real time degli acidi nucleici utilizzata in questo prodotto, a causa della sua elevata sensibilità analitica, è soggetta a contaminazione da parte di campioni clinici positivi, dei controlli positivi e degli stessi prodotti della reazione di amplificazione. Le contaminazioni portano a risultati falsi positivi. Le modalità di realizzazione del prodotto sono in grado di limitare le contaminazioni; tuttavia questi fenomeni possono essere evitati solo con una buona pratica delle tecniche di laboratorio e seguendo attentamente le istruzioni fornite in questo manuale.

Questo prodotto richiede personale professionale competente e addestrato alla manipolazione di campioni biologici in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati pericolosi per evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e aree di lavoro adeguate alla manipolazione di campioni biologici in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati pericolosi per evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede personale professionale competente e addestrato per le procedure di biologia molecolare, come l'estrazione, la trascrizione inversa, l'amplificazione e la rilevazione di acidi nucleici per evitare risultati errati.

Questo prodotto richiede aree separate per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione per evitare risultati falsi positivi.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e strumenti dedicati per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione per evitare risultati falsi positivi.

A causa delle differenze intrinseche alle diverse tecnologie, si raccomanda di eseguire studi di correlazione per stimare queste differenze prima di passare a un nuovo prodotto.

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che l'mRNA P210 non è stato rilevato nel prodotto della trascrizione inversa ottenuto dall'RNA estratto dal campione, ma non si può escludere che l'mRNA P210 sia presente ad un titolo inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedi paragrafo Caratteristiche delle Prestazioni); in questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

Un risultato non valido ottenuto con questo prodotto indica che non è stato possibile rilevare in modo efficiente l'mRNA ABL; in questo caso l'analisi del campione dovrà essere ripetuta a partire dall'estrazione con possibili ritardi nell'ottenimento del risultato.

Eventuali polimorfismi nelle regioni del genoma del paziente in cui ibridano gli oligonucleotidi di innescio e la sonda del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione e la quantificazione dell'mRNA P210 e dell'mRNA ABL.

Come per qualunque altro dispositivo diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli altri esami di laboratorio relativi al paziente.

Come per qualunque altro dispositivo diagnostico, esiste un rischio residuo di ottenere risultati non validi, falsi positivi e falsi negativi con questo prodotto. Questo rischio residuo non può essere eliminato o ridotto ulteriormente. Questo rischio residuo in situazioni particolari può contribuire a decisioni errate con conseguenze potenzialmente gravi per il paziente.

**PROBLEMI E SOLUZIONI**

<b>Target non rilevato nella reazione dei Q - PCR Standard oppure nel Controllo Positivo oppure Coefficiente di determinazione della Curva standard non valido</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
Errore nella preparazione della miscela completa di reazione.	Controllare i volumi di reagenti dispensati durante la preparazione della miscela completa di reazione.
Errore nella dispensazione nella micropietra.	Dispensare con cura i reagenti nella micropietra seguendo il piano di lavoro. Controllare i volumi di miscela completa di reazione dispensati. Controllare i volumi di standard dispensati.
Errore nell'impostazione dell' ELITE InGenius	Controllare le posizioni delle miscele complete di reazione, controllo positivo, o standard. Controllare i volumi delle miscele complete di reazione, controllo positivo, o standard.
Degradazione della sonda.	Utilizzare una nuova aliquota di PreMix.
Degradazione della PCR MasterMix.	Utilizzare una nuova aliquota di PCR MasterMix.
Degradazione degli standard o del controllo positivo.	Utilizzare una nuova aliquota di standard o di controllo positivo.
Errore nell'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione delle reazioni degli standard impostata sullo strumento. Controllare il ciclo termico impostato sullo strumento.
Errore dello strumento.	Contattare ELITechGroup Technical Service.

<b>Target rilevato nella reazione di Controllo negativo</b>	
<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzioni</b>
Errore nella dispensazione nella micropietra.	Evitare di spargere il contenuto delle provette dei campioni. Cambiare sempre puntale tra un campione e l'altro. Dispensare con cura campioni, controllo negativo e standard nella micropietra seguendo il piano di lavoro.
Errore nell'impostazione dell' ELITE InGenius	Controllare le posizioni delle miscele complete di reazione o del controllo negativo. Controllare i volumi delle miscele complete di reazione o del controllo negativo.
Errore durante l'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione di campioni, controllo negativo e standard impostata sullo strumento.
Micropietra sigillata male.	Sigillare con attenzione la micropietra.
Contaminazione dell'acqua per biologia molecolare.	Utilizzare una nuova aliquota di acqua.
Contaminazione della miscela completa di reazione.	Preparare una nuova aliquota di miscela completa di reazione.
Contaminazione dell'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.	Pulire superfici e strumenti con detergenti acquosi, lavare camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare ELITechGroup Technical Service.

**Profilo di amplificazione del target anomalo o target non rilevato nelle reazioni dei campioni**

Possibili cause	Soluzioni
Errore nella preparazione della miscela completa di reazione.	Controllare i volumi di reagenti dispensati durante la preparazione della miscela completa di reazione. Verificare di aver aggiunto la RT EnzymeMix alla miscela completa di reazione.
Errore nella dispensazione nella micropietra.	Evitare di spargere il contenuto delle provette dei campioni. Cambiare sempre puntale tra un campione e l'altro. Dispensare con cura campioni nella micropietra seguendo il piano di lavoro.
Errore nell'impostazione dell' ELITe InGenius	Controllare le posizioni delle miscele complete di reazione. Controllare i volumi delle miscele complete di reazione.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti	Ripetere l'amplificazione a partire dall'eluato, diluendolo 1:2 in acqua per biologia molecolare, in una sessione "PCR only". Ripetere l'estrazione e l'amplificazione del campione eseguendo un lavaggio in più del pellet di cellule bianche per rimuovere completamente le tracce di globuli rossi prima della lisi.
Degradazione della RT EnzymeMix.	Utilizzare una nuova aliquota di RT EnzymeMix.
Problemi di conservazione dei reagenti.	Verificare che l'RT EnzymeMix non sia rimasto esposto a temperature superiori a -20 °C per oltre 10 minuti. Verificare che la miscela completa di reazione non sia rimasta esposta a temperature ambiente per oltre 30 minuti.
Problemi durante la fase di estrazione	Verificare la qualità e la concentrazione dell'RNA estratto.
Errore dello strumento.	Contattare ELITechGroup Technical Service.

**Presenza di fluorescenza di fondo irregolare o elevata nelle reazioni**

Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione del campione.	Mescolare con cura, pipettando per tre volte, campioni, controllo negativo e standard nella miscela completa di reazione. Evitare di creare bolle sia sul fondo del pozzetto sia in superficie.
Errore nell'impostazione della "baseline".	Impostare l'intervallo di calcolo della "baseline" in un ambito di cicli in cui la fluorescenza di fondo sia già stabilizzata (controllare le registrazioni "Results", "Component") e la fluorescenza del segnale non abbia ancora cominciato a crescere, per esempio dal ciclo 6 al ciclo 15. Impostare il calcolo automatico della "baseline" selezionando l'opzione "Auto Baseline".

**Errore 30103 su ELITe InGenius**

Possibili cause	Soluzioni
Concentrazione del target troppo alta nel campione.	Se è presente un segnale significativo nel plot di PCR: - ripetere l'amplificazione a partire dall'eluato, diluendolo 1:10 in acqua per biologia molecolare, in una sessione "PCR only" oppure - ripetere l'estrazione del campione, diluendolo 1:10 in acqua per biologia molecolare, in una sessione "Extract + PCR".

**LEGENDA DEI SIMBOLI**

	Numero di catalogo.
	Limite superiore di temperatura.
	Codice del lotto.
	Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).
	Dispositivo medico diagnostico in vitro.
	Conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medici diagnostici in vitro.
	Contenuto sufficiente per "N" test.
	Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso.
	Contenuti.
	Tenere lontano dalla luce solare.
	Fabbricante.

**AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA**

Questo prodotto contiene reagenti prodotti da Life Technologies Corporation e sono venduti in base al contratto di licenza tra ELITechGroup S.p.A. e suoi affiliati e Life Technologies Corporation. Il prezzo di acquisto di questo prodotto include i diritti - limitati e non trasferibili - di utilizzare solo questa quantità di prodotto, unicamente per attività dell'acquirente che siano direttamente correlate alla diagnostica umana. Per informazioni sull'acquisto di una licenza per questo prodotto per scopi diversi da quelli definiti sopra, contattare il Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Val Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefono: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. Email: [outlicensing@thermofisher.com](mailto:outlicensing@thermofisher.com).

I reagenti di rilevazione ELITe MGB® sono coperti da uno o più dei brevetti US numero 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 e dei brevetti EP numero 0819133, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 nonché da richieste di brevetti che sono attualmente pendenti.

Questa licenza limitata consente alla persona o all'entità legale a cui questo prodotto è stato fornito di usare il prodotto, e i dati generati dall'uso del prodotto, solo per la diagnostica umana. Né ELITechGroup S.p.A. né i suoi licenziatari attribuiscono qualsiasi altra licenza, esplicita o implicita per qualsiasi altro scopo.

"ELITe MGB®" e il logo "ELITe MGB®" sono registrati come marchi commerciali nell'Unione Europea.  
TRI Reagent® è un marchio registrato di Molecular Research Center, Inc.  
Ficol® è un marchio registrato di GE Healthcare Bio-Sciences, AB.  
Maxwell® CSC è un marchio registrato di Promega Corporation.