



## NOTICE of CHANGE dated 28/11/2023

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

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

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

- *Updated transport and storage conditions for primary sample*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

### PLEASE NOTE

	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



**BCR-ABL P210 ELITE MGB® Kit**  
réactifs pour la transcription inverse de l'ARN  
et l'amplification en temps réel de l'ADNc

REF RTSG07PLD210

Le produit est destiné à être utilisé, parallèlement aux données cliniques et à d'autres tests de laboratoire, pour le diagnostic et la surveillance des cas de leucémie myéloïde chronique (LMC), de leucémie myéloïde aiguë (LMA) et de leucémie lymphoblastique aiguë (LLA), positif pour le marqueur P210.

Les résultats obtenus avec ce produit peuvent être alignés sur l'échelle internationale (IS) par un facteur de conversion pouvant être calculé à l'aide du produit «**PHILADELPHIA P210 RNA Reference**», fabriqué par ELITechGroup S.p.A. et étalonné par rapport au "1st World Health Organization (WHO) International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL translocation by RQ-PCR".

**BCR-ABL P210 ELITE MGB® Kit**  
réactifs pour la transcription inverse de l'ARN et  
l'amplification en temps réel de l'ADNc

REF RTSG07PLD210



**TABLE DES MATIÈRES**

APPLICATION	page 1
PRINCIPES DE L'ANALYSE	page 2
DESCRIPTION DU PRODUIT	page 3
MATÉRIEL FOURNI	page 4
MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI	page 4
AUTRES PRODUITS REQUIS	page 4
AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS	page 5
ELITE INGENIUS®	page 7
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 8
PROCÉDURE	page 8
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	page 18
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	page 20
ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES	page 21
PROCÉDURE	page 21
CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	page 30
BIBLIOGRAPHIE	page 33
LIMITES DE LA PROCÉDURE	page 34
PROBLÈMES ET SOLUTIONS	page 35
LÉGENDE DES SYMBOLES	page 37
NOTE POUR L'ACQUÉREUR: LICENCE LIMITÉE	page 38

**APPLICATION**

Le produit «**BCR-ABL P210 ELITE MGB® Kit**» fait partie d'un test qualitatif et quantitatif, de transcription inverse et d'amplification d'acides nucléiques pour la **détection de l'ARNm du réarrangement BCR-ABL, translocation t(9;22), chromosome Philadelphia, variante de P210 (P210)** et la **quantification de l'ARNm de P210 par rapport à l'ADNc du gène codant pour la protéine kinase Abelson (ABL)** dans des échantillons d'ARN total extraits de suspensions lymphomonocytaires et leucocytaires provenant d'échantillons cliniques de sang périphérique ou de sang médullaire.

**PRINCIPES DE L'ANALYSE**

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

Pour chaque échantillon d'ARN extrait, l'analyse implique **une réaction spécifique en double pour une région d'ARNm de P210 (cible) et une réaction spécifique en double pour une région d'ARNm d'ABL (contrôle)**.

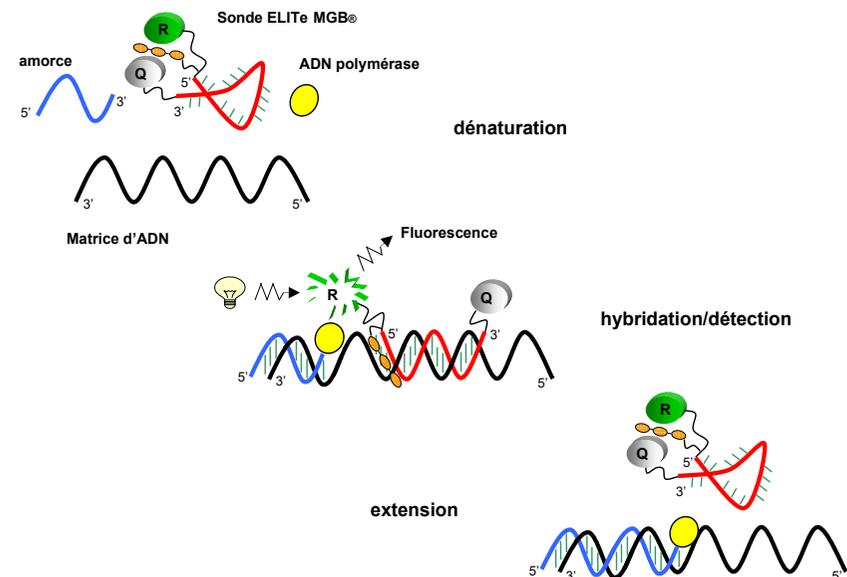
La sonde spécifique de l'ADNc de P210 dotée de la technologie ELITE MGB® marquée au fluorophore FAM, est activée lorsqu'elle s'hybride avec le produit spécifique de la réaction d'amplification de l'ADNc de P210.

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

Lorsque le produit spécifique de la réaction d'amplification augmente, l'émission de fluorescence augmente également et est mesurée et enregistrée par l'instrument. Le traitement des données détermine la présence et le titrage d'ARNm de P210 et d'ABL dans l'échantillon de départ.

Le test a été validé sur les systèmes présentés dans ce manuel d'instruction.

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



**DESCRIPTION DU PRODUIT**

Le produit «BCR-ABL P210 ELITe MGB® Kit» fournit les composants suivants:

• **P210 PreMix**

Un mélange d'oligonucléotides, spécifique à la transcription inverse et à l'amplification en temps réel de P210, dans une solution stabilisée, **aliquoté dans un tube à essai** (capuchon BLANC) contenant **270 µl** de solution, en quantité suffisante pour **36 réactions** en association avec «**ELITe InGenius®**» et **50 réactions** en association avec autres systèmes.

Les oligonucléotides d'amorce et la sonde spécifique à P210 (stabilisés par le groupe MGB®, marqués par le fluorophore FAM et désactivés par une molécule non fluorescente), spécifiques d'une région de l'ARNm générée par un **réarrangement BCR-ABL (variantes P210 b3a2 et variante P210 b2a2)**.

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

• **ABL PreMix**

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

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

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

• **PCR MasterMix**

Un mélange de réactifs optimisés et stabilisés pour la transcription inverse et l'amplification en temps réel, **aliquoté dans 2 tubes à essai** (capuchon NEUTRE). Chaque tube contient **820 µl** de solution – un volume suffisant pour **36 réactions** en association avec «**ELITe InGenius®**» et **50 réactions** en association avec autres systèmes.

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

• **RT EnzymeMix**

Un mélange de réactifs optimisés et stabilisés pour la transcription inverse, **aliquoté dans 2 tubes à essai** (capuchon NOIR). Chaque tube contient **20 µl** de solution – un volume suffisant pour **36 réactions** en association avec «**ELITe InGenius®**» et **50 réactions** en association avec autres systèmes.

Le mélange fournit l'enzyme de transcriptase inverse.

Le produit permet d'effectuer **18 déterminations d'ARNm de P210 en double** et **18 déterminations d'ARNm d'ABL en double en association avec «ELITe InGenius®**», y compris les étalons et les contrôles.

Le produit permet d'effectuer **25 déterminations d'ARNm de P210 en double** et **25 déterminations d'ARNm d'ABL en double en association avec** le « 7300 Real Time PCR System », « 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument » and « 7900 Real-Time PCR System », y compris les étalons et les contrôles (p. ex., un nombre maximum de **19 échantillons cliniques** en une seule session) (dans des conditions d'utilisation optimales).

**MATÉRIEL FOURNI**

Composant	Description	Quantité	Classification des risques
<b>P210 PreMix</b>	Mélange d'amorces/sondes d'oligonucléotides Capuchon BLANC	1 x 270 µl	-
<b>ABL PreMix</b>	Mélange d'amorces/sondes d'oligonucléotides Capuchon NEUTRE	1 x 270 µl	-
<b>PCR MasterMix</b>	Mélange de réactifs pour la transcription inverse et l'amplification en temps réel Capuchon NEUTRE	2 x 820 µl	-
<b>RT EnzymeMix</b>	Transcriptase inverse Capuchon NOIR	2 x 20 µl	-

**MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI**

- Hotte à flux laminaire.
- Gants non poudrés en nitrile jetables ou matériel similaire.
- Agitateur de type vortex.
- Microcentrifugeuse de paillasse (12000 – 14000 tr/min).
- Micropipettes et embouts stériles avec filtre pour les aérosols ou à déplacement positif (2-20 µl, 5-50 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl).
- Eau de qualité biologie moléculaire.
- Tube à jupe de Sarstedt de 2,0 mL avec bouchon à vis (Sarstedt, réf. 72.694.005).
- Microtubes en polypropylène de 1,5 ml pour la biologie moléculaire.
- Thermostat programmable avec système de détection optique de fluorescence, 7300 Real Time PCR System, 7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument or 7900 Real-Time PCR System étalonné selon les instructions du fabricant.

**AUTRES PRODUITS REQUIS**

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

Pour l'extraction automatique avec l'instrument « **ELITe InGenius®** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT030) les produits génériques suivants sont requis : les cartouches d'extraction « **ELITe InGenius® SP RNA** » (ELITechGroup S.p.A., réf. INT032SPRNA), le « **ELITe InGenius DNase I** » (ELITechGroup S.p.A. INT034DNASE), le « **Dnase Tube Adapter Kit** » (réf. G6431-000), les consommables pour l'extraction et l'amplification d'acides nucléiques à partir d'échantillons biologiques « **ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set** » (ELITechGroup S.p.A, réf. INT032CS), « **ELITe InGenius® Waste Box** » (ELITechGroup S.p.A, réf. F2102-000), « **ELITe InGenius® PCR Cassette** » (ELITechGroup S.p.A, réf. INT035PCR), et « **300 µL Filter Tips Axygen** » (Axygen BioScience Inc., CA, réf. TF-350-L-R-S).

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

- pour les calibrateurs «**BCR-ABL P210 ELITe STD\_P210**» et «**BCR-ABL P210 ELITe STD\_ABL**»,
- pour l'amplification du contrôle positif «**BCR-ABL P210 ELITe\_PC**»,
- pour l'amplification du contrôle négatif «**BCR-ABL P210 ELITe\_NC**»,
- pour l'analyse des échantillons «**BCR-ABL P210 ELITe\_PBL\_200\_100**».

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

Lorsqu'un système 7300 Real-Time PCR System ou 7900 Real-Time PCR System est utilisé, il est recommandé d'utiliser le produit générique «**Q - PCR Microplates**» (ELITechGroup S.p.A., réf RTSACC01), des microplaques comprenant des puits de 0,2 ml et des feuilles de scellement adhésives pour l'amplification en temps réel.

Lorsqu'un un système 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ou 7900 Real-Time PCR System est utilisé, il est recommandé d'utiliser le produit générique «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., code RTSACC02), des microplaques comprenant des puits de 0,1 ml et des feuilles de scellement adhésives pour l'amplification en temps réel.

Pour la détection et la quantification de l'ARNm de P210 et d'ABL, il est nécessaire d'utiliser le produit «**BCR-ABL P210 ELITe Control**» (ELITechGroup S.p.A., réf CTRG07PLD210), contrôle positif de l'ADN plasmidique.

Pour la détection et la quantification de l'ARNm de P210 et d'ABL, il est nécessaire d'utiliser le produit «**BCR-ABL P210 ELITe Standard**» (ELITechGroup S.p.A., réf STDG07PLD210), contenant cinq dilutions d'ADN plasmidique de quantité connue, pour obtenir les courbes d'étalonnage de P210 et ABL.

Le produit «**PHILADELPHIA P210 RNA Reference**» (ELITechGroup S.p.A., réf SPG07-210), contenant quatre mélanges d'ARN total en quantité connue pour le calcul du facteur de conversion, est recommandé afin d'exprimer les résultats en échelle internationale (IS) par rapport au "1<sup>st</sup> World Health Organization (WHO) International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL translocation by RQ-PCR".

Pour le prétraitement du sang, utilisez un produit générique validé en laboratoire, tel que la solution « Cell Lysis Solution » (Promega, Réf. A7933), le tampon « RNA Lysis Buffer » (Promega, Réf. Z3051) et le thioglycérol (Promega, Réf. A208B-C) ou des réactifs équivalents (tels que « Solution A » (Promega, Réf. MC130A), la « Solution B » (Promega, Réf. MC131A) et le thioglycérol (Promega, Réf. MC132A).

## AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

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

### Avertissements et précautions d'ordre général

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

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

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

Ne jamais pipeter les solutions avec la bouche.

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

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

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

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

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

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

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

Ne pas mélanger des réactifs provenant de lots différents.

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

### Avertissements et précautions pour la biologie moléculaire

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

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

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

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

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

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

### Avertissements et précautions spécifiques pour les composants

- **P210 PreMix**  
Le mélange **P210 PreMix** doit être conservé à -20 °C à l'abri de la lumière.  
Le mélange **P210 PreMix** peut être congelé et décongelé **six fois** au maximum : des cycles de congélation/décongélation supplémentaires risqueraient d'entraîner une réduction des performances du produit.
- **ABL PreMix**  
Le mélange **ABL PreMix** doit être conservé à -20 °C à l'abri de la lumière.  
Le mélange **ABL PreMix** peut être congelé et décongelé **six fois** au maximum : des cycles de congélation/décongélation supplémentaires risquent d'entraîner une réduction des performances du produit.
- **PCR MasterMix**  
Le mélange **PCR MasterMix** doit être conservé à -20 °C.  
Le mélange **PCR MasterMix** peut être congelé et décongelé **six fois** au maximum : des cycles de congélation/décongélation supplémentaires risqueraient d'entraîner une réduction des performances du produit.
- **RT EnzymeMix**  
Le mélange **RT EnzymeMix** doit être conservé à -20 °C.  
Le mélange **RT EnzymeMix** ne doit pas être exposé à des températures supérieures à -20 °C pendant plus de 10 minutes pour un maximum de **six fois**.

**Système ELITe InGenius®**

**ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES**

**Échantillons**

Ce produit doit être utilisé avec les échantillons cliniques suivants :

**Sang périphérique prélevé sur EDTA ou sur citrate de sodium**

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

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

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

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

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



Retirer le surnageant et remettre en suspension dans 2 ml de solution de lyse cellulaire « Cell Lysis Solution » en le transférant dans un tube de 2 ml ; centrifuger à nouveau pendant environ 2 minutes à 3000 RCF ; retirer le surnageant avec précaution (attention à éliminer les traces de globules rouges au-dessus du culot de globules blancs) et remettre le culot en suspension dans 200 µl de solution de lyse (1 ml de tampon de lyse « RNA Lysis Buffer », Promega, réf. Z3051 + 20 µl de 1-Thioglycérol, Promega, réf. A208B-C).

**Remarque :** lorsque l'extraction des acides nucléiques est réalisée sur le système **ELITe InGenius** et avec le logiciel **ELITe InGenius®** version 1.3 (ou versions ultérieures équivalentes), utiliser le protocole d'extraction **BCR-ABL P210 ELITe\_PBL\_200\_100**. Ce protocole comprend le traitement de 200 µl d'échantillon et l'élué des acides nucléiques dans 100 µl.

**Substances interférentes**

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

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

**PROCÉDURE**

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

La procédure d'utilisation du **BCR-ABL P210 ELITe MGB® Kit** avec le système **ELITe InGenius** comporte trois étapes :

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

**Vérification de la préparation du système**

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

- mettre le système **ELITe InGenius** en marche et sélectionner le mode « **FERMÉ** » (CLOSED) ;
- vérifier que les calibrateurs (**BCR-ABL P210 Q-PCR Standard**) ont été analysés, approuvés et ne présentent pas le statut (Status) Expiré en association avec le lot de réactifs d'amplification à utiliser. En l'absence de calibrateurs d'amplification approuvés ou valides, il convient de les analyser comme décrit aux paragraphes suivants,
- vérifier que les contrôles d'amplification (Contrôles, **BCR-ABL P210 Positive Control**, **BCR-ABL P210 Negative Control**) ont été analysés, approuvés et ne présentent pas le statut (Status) Expiré en association avec le lot de réactifs d'amplification à utiliser. En l'absence de contrôles d'amplification approuvés ou valides, il convient de les analyser comme décrit aux paragraphes suivants,
- choisir le type d'analyse, en suivant les instructions de l'interface graphique utilisateur (GUI) concernant le paramétrage de la session d'analyse et en utilisant les protocoles de test fournis par ELITeGroup S.p.A. Ces protocoles de DIV ont été spécifiquement validés avec les kits **ELITe MGB®**, l'instrument **ELITe InGenius** et la matrice indiquée.

Le protocole de test disponible pour tester des échantillons à l'aide du produit **BCR-ABL P210 ELITe MGB® Kit** est décrit dans le tableau ci-dessous.

Protocole de test pour le BCR-ABL P210 ELITe MGB® Kit			
Nom	Matrice	Indication du rapport	Caractéristiques
<b>BCR-ABL P210 ELITe_PBL_200_100</b>	Leucocytes du sang périphérique	% P210	Volume d'extraction initial : 200 µl Volume d'élué extrait : 100 µl Sonication : NON Contrôle interne : NON Volume de PCR Mix : 20 µl Volume initial de PCR de l'échantillon : 10 µl

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

**Paramétrage de la session**

Le produit **BCR-ABL P210 ELITe MGB® Kit** peut être utilisé avec le système **ELITe InGenius** pour les opérations suivantes :

- A. Analyse intégrée (Extract + PCR [Extraction + PCR]),
- B. Analyse d'amplification (PCR only [PCR uniquement]),
- C. Analyse de calibration (PCR only [PCR uniquement]),
- D. Analyse d'amplification du contrôle positif et négatif (PCR only [PCR uniquement]).

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

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

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

- Décongeler les tubes à essai du mélange **P210 PreMix** (capuchon BLANC) et du mélange **ABL PreMix** (capuchon NEUTRE) nécessaires à la session d'analyse pendant 30 minutes à température ambiante (+18/25 °C), en se rappelant que le contenu de chaque tube à essai est suffisant pour effectuer **36 réactions**. Agiter au vortex pendant 10 secondes à trois reprises, centrifuger les tubes pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond puis conserver les tubes sur de la glace.
- Décongeler les tubes à essai du mélange **PCR MasterMix** (capuchon NEUTRE) nécessaires à la session d'analyse pendant 30 minutes à température ambiante (+18/25 °C), en se rappelant que le contenu de chaque tube à essai est suffisant pour effectuer **36 réactions**. Agiter au vortex pendant 10 secondes à trois reprises, centrifuger les tubes pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond puis conserver les tubes sur de la glace.
- Sortir les tubes de **RT EnzymeMix** (capuchon avec un insert NOIR) nécessaires pour la session d'analyse, en se rappelant que le contenu de chaque tube est suffisant pour effectuer **36 réactions**. Agiter délicatement les tubes, centrifuger pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond puis conserver les tubes sur de la glace.

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

- Préparer un tube à capuchon vissant de 2 ml (Sarstedt réf. 72.694.005, non inclus dans le kit) pour le **mélange réactionnel complet** et le marquer de manière reconnaissable avec un marqueur permanent.
- Calculer les volumes des trois composants inclus dans le kit qui sont nécessaires à la préparation du **mélange réactionnel complet** :

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

Cible	Nombre d'échantillons	PreMix	PCR MasterMix	RT EnzymeMix
P210	5	30 µl	90 µl	0,9 µl
ABL	3	20 µl	60 µl	0,6 µl

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

Nombre d'échantillons	P210 ou ABL PreMix	PCR MasterMix	RT EnzymeMix
1	15 µl	45 µl	0,5 µl
2	25 µl	75 µl	0,8 µl
3	40 µl	120 µl	1,2 µl

- Préparer le **mélange réactionnel complet** en ajoutant les volumes calculés des trois composants au tube de 2 ml dédié.
- Agiter **au vortex à basse vitesse** à trois reprises pendant 10 secondes, centrifuger pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond puis conserver le tube sur de la glace.

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

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

#### A. Analyse intégrée

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

- Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
- Vérifier que le « Volume d'extraction initial » (Extraction Input Volume) est de 200 µl et que le « Volume d'éluat extrait » (Extracted Elute Volume) est de 100 µl.
- Pour chaque « Position » (Track) d'intérêt, renseigner l'« ID échantillon » (SampleID - SID) en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
- Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Test » (Assay) (c'est-à-dire BCR-ABL P210 ELITe\_PBL\_200\_100).
- Vérifier que le « Protocole » (Protocol) affiché est : « Extraction + PCR » (Extract + PCR).
- Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Position échantillons » (Sample Position) est « Tube d'extraction (ligne inférieure) » [Extraction Tube (bottom row)]. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger le **mélange réactionnel complet** sur le « Bloc inventaire » (Inventory Block) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Zone inventaire » (Inventory Area) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Charger la « Cassette de PCR » (PCR Cassette), les cartouches d'extraction « ELITe InGenius SP RNA » et la « ELITe InGenius DNase I », tous les consommables requis et les échantillons à extraire aux positions spécifiées à l'étape 8 en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
- Fermer le tiroir de l'instrument.
- Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

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

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

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

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

## B. Analyse d'amplification

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

1. Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
2. Même si aucune extraction ne sera effectuée, vérifier que le « Volume d'extraction initial » (Extraction Input Volume) est de 200 µl et que le « Volume d'élution extrait » (Extracted Elute Volume) est de 100 µl.
3. Pour chaque « Position » (Track) d'intérêt, renseigner le SID en le saisissant ou en scannant le code-barres de l'échantillon.
4. Sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Test » (Assay) (c'est-à-dire BCR-ABL P210 ELITe\_PBL\_200\_100).
5. Sélectionner « PCR uniquement » (PCR Only) dans la colonne « Protocole » (Protocol).
6. Vérifier que la position de chargement de l'échantillon dans la colonne « Position échantillons » (Sample Position) est « Tube d'élution (ligne inférieure) » [Elution Tube (bottom row)]. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
7. Charger le **mélange réactionnel complet** sur le « Bloc inventaire » (Inventory Block) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
8. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Zone inventaire » (Inventory Area) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
9. Charger les « Cassettes de PCR » (PCR Cassettes) et les échantillons d'acide nucléique extraits en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
10. Fermer le tiroir de l'instrument.
11. Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

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

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

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

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

## C. Analyse de calibration

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

1. Décongeler un tube de chaque niveau de BCR-ABL P210 Q - PCR Standard pour la calibration de 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>). Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
2. Décongeler un autre tube de BCR-ABL P210 Q - PCR Standard 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> et 10<sup>3</sup> pour la calibration d'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>). Chaque tube permet d'effectuer 4 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
3. Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
4. Même si aucune extraction ne sera effectuée, vérifier que le « Volume d'extraction initial » (Extraction Input Volume) est de 200 µl et que le « Volume d'élution extrait » (Extracted Elute Volume) est de 100 µl.
5. Pour la calibration de P210, sélectionner le protocole de test « BCR-ABL P210 ELITe\_STD\_P210 » dans la colonne « Test » (Assay) et renseigner le numéro de lot et la date de péremption du **BCR-ABL P210 Q-PCR Standard**.
6. Pour la calibration d'ABL, sélectionner le protocole de test « BCR-ABL P210 ELITe\_STD\_ABL » dans la colonne « Test » (Assay) et renseigner le numéro de lot et la date de péremption du **BCR-ABL P210 Q-PCR Standard**.
7. Charger le **mélange réactionnel complet** sur le « Bloc inventaire » (Inventory Block) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
8. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Zone inventaire » (Inventory Area) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
9. Charger les « Cassettes de PCR » (PCR Cassettes) et les tubes **BCR-ABL P210 Q-PCR Standard** en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
10. Fermer le tiroir de l'instrument.
11. Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

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

**Remarque :** au terme de l'analyse, les **BCR-ABL P210 Q-PCR Standard** restants doivent être retirés de l'instrument, bouchés et conservés à -20 °C.

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

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

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

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

1. Décongeler le tube BCR-ABL P210 - ELITe Positive Control pour la session d'analyse. Chaque tube permet d'effectuer 2 sessions d'analyse. Mélanger délicatement et centrifuger le contenu des tubes pendant 5 secondes.
2. Transférer au minimum 80 µl d'eau de qualité biologie moléculaire dans un « Tube d'élution » (Elution tube) inclus dans le « ELITe InGenius SP 200 Consumable Set ».
3. Sélectionner « Exécuter l'analyse » (Perform Run) dans l'écran « Accueil » (Home).
4. Même si aucune extraction ne sera effectuée, vérifier que le « Volume d'extraction initial » (Extraction Input Volume) est de 200 µl et que le « Volume d'élution extrait » (Extracted Elute Volume) est de 100 µl.
5. Dans la « Position » (Track) d'intérêt, sélectionner le protocole de test à utiliser dans la colonne « Test » (Assay).
6. Pour le contrôle positif, sélectionner le protocole de test « BCR-ABL P210 ELITe\_PC » dans la colonne « Test » (Assay) et renseigner le numéro de lot et la date de péremption du BCR-ABL P210 Positive Control.
7. Pour le contrôle négatif, sélectionner le protocole de test « BCR-ABL P210 ELITe\_NC » dans la colonne « Test » (Assay) et renseigner le numéro de lot et la date de péremption de l'eau de qualité biologie moléculaire.
8. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
9. Charger le **mélange réactionnel complet** sur le « Bloc inventaire » (Inventory Block) sélectionné en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
10. Charger et vérifier les portoirs de cônes dans la « Zone inventaire » (Inventory Area) sélectionnée en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
11. Charger les « Cassettes de PCR » (PCR Cassettes), le tube BCR-ABL P210 Positive Control et le tube de contrôle négatif en suivant les instructions de la GUI. Cliquer sur « Suivant » (Next) pour poursuivre le paramétrage.
12. Fermer le tiroir de l'instrument.
13. Appuyer sur « Démarrer » (Start) pour lancer l'analyse.

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

**Remarque :** au terme de l'analyse, le **BCR-ABL P210 Positive Control** restant doit être retiré de l'instrument, bouché et conservé à -20 °C. Le contrôle négatif restant doit être mis au rebut.

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

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

#### Examen et approbation des résultats

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

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

Le système **ELITe InGenius** génère les résultats à l'aide du produit **BCR-ABL P210 ELITe MGB® Kit** en exécutant la procédure suivante :

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

##### A. Validation de la courbe de calibration

Les signaux de fluorescence émis par la sonde pour P210 (Canal 1 « P210 ») dans les réactions d'amplification du calibrateur sont analysés automatiquement et interprétés par le logiciel de l'instrument avec les paramètres inclus dans le protocole de test « BCR-ABL ELITe\_STD\_P210 ».

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

Les courbes de calibration de P210 et ABL, spécifiques au lot de réactifs d'amplification, sont stockées dans la base de données (Calibration) [Calibration]. Elles peuvent être visualisées et approuvées par du personnel qualifié disposant des privilèges « Administrateur » (Administrator) ou « Analyste » (Analyst), en suivant les instructions de la GUI.

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

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

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

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

Les signaux de fluorescence émis par la sonde pour P210 (Canal 1 « P210 ») dans la réaction d'amplification du contrôle positif et du contrôle négatif sont analysés automatiquement et interprétés par le logiciel de l'instrument avec les paramètres inclus dans les protocoles de test « BCR-ABL P210 ELITe\_PC » et « BCR-ABL P210 ELITe\_NC ».

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

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

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

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

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

### C. Validation des résultats des échantillons

Les signaux de fluorescence émis par la sonde pour P210 (Canal 1 « P210 ») et par la sonde pour ABL (Canal 1 « ABL ») dans les réactions d'amplification de l'échantillon sont analysés automatiquement et interprétés par le logiciel de l'instrument avec les paramètres inclus dans le protocole de test BCR-ABL P210\_PBL\_200\_100.

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

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

1) Courbe de calibration	Statut
BCR-ABL P210 Q-PCR Standard	APPROUVÉ
2) Contrôle positif	Statut
BCR-ABL P210 Positive Control	APPROUVÉ
3) Contrôle négatif	Statut
BCR-ABL P210 Negative Control	APPROUVÉ

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

Dans le cas des réactions d'amplification de chaque échantillon, les valeurs **Ct P210** (P210 Ct) sont utilisées pour détecter et quantifier la présence d'ARNm cible, tandis que les valeurs **Ct ABL** (ABL Ct) sont utilisées pour détecter et quantifier la présence d'ARNm de contrôle (validation de l'extraction et normalisation de la cible).

Les valeurs **Ct P210** (P210 Ct) et **Ct ABL** (ABL Ct) dans les réactions d'amplification de chaque échantillon et les **courbes de calibration** sont utilisées pour calculer la **quantité d'ARNm** de P210 et ABL présente dans les réactions d'amplification des échantillons. Les **quantités d'ARNm** de P210 et ABL sont ensuite utilisées pour calculer le **pourcentage de copies d'ARNm de P210** normalisées en fonction du nombre de copies d'ARNm d'ABL (% P210).

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

Résultat de l'analyse de l'échantillon	Interprétation
Le pourcentage de P210 est x,xxxx % (P210:percentage is x.xxxx%)	<b>L'ARN de P210 a été détecté.</b> La valeur % P210 calculée s'affiche.
P210: le pourcentage est 0,0000% (P210:percentage is 0.0000%)	<b>L'ARN de P210 n'a pas été détecté ou est inférieur à la limite de détection</b> du test. Équivalent à % P210 = 0 %.
Non concluant - Tester à nouveau l'échantillon (Inconclusive - Retest Sample)	<b>L'ARN de P210 a été détecté mais le % P210 ne peut pas être calculé.</b> Les différences entre les quantités de P210 dans l'échantillon en double ne sont pas acceptables. Tester à nouveau l'échantillon.
Non valide - Tester à nouveau l'échantillon (Invalid - Retest Sample)	<b>L'ARN d'ABL est inférieur à la valeur seuil (10 000 copies).</b> Tester à nouveau l'échantillon.

Pour compléter les informations de chaque échantillon analysé, les résultats des réactions individuelles (Positions [Tracks]) pour les cibles P210 et ABL sont rapportés de la manière suivante.

Résultat d'un seul réplicat	Interprétation
P210 : ARN détecté, quantité égale à xxx copies/réaction (P210: RNA Detected, quantity equal to xxx copies/reaction)	<b>L'ARN de P210 a été détecté.</b> La quantité calculée d'ARNm de P210 s'affiche.
P210 : ARN non détecté ou inférieur à la LoD (P210: RNA Not detected or below the LoD)	<b>L'ARN de P210 n'a pas été détecté ou est inférieur à la limite de détection</b> du test.
ABL : ARN détecté, quantité égale à xxx copies/réaction (ABL: RNA Detected, quantity equal to xxx copies/reaction)	<b>L'ARN d'ABL a été détecté.</b> La quantité calculée d'ARNm d'ABL s'affiche.
ABL : ARN non détecté ou inférieur à la LoD (ABL: RNA Not detected or below the LoD)	<b>L'ARN d'ABL n'a pas été détecté ou est inférieur à la limite de détection</b> du test.

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

Échantillon	P210 (copies/réaction)	ABL (copies/réaction)	Résultat de l'analyse de l'échantillon (% P210)	Interprétation
1 <sup>er</sup> réplicat	Quantité	Quantité ≥ 10 000	Le pourcentage de P210 est x,xxxx % (P210 percentage is x.xxxx%)	<b>L'ARN de P210 a été détecté.</b> La valeur % P210 calculée s'affiche.
2 <sup>e</sup> réplicat	Quantité	Quantité ≥ 10 000		
1 <sup>er</sup> réplicat	Non détecté	Quantité ≥ 10 000	ARN de P210 non détecté ou inférieur à la LoD (P210 RNA Not Detected or below the LoD)	<b>L'ARN de P210 n'a pas été détecté ou est inférieur à la limite de détection</b> du test. Équivalent à % P210 = 0 %
2 <sup>e</sup> réplicat	Non détecté	Quantité ≥ 10 000		
1 <sup>er</sup> réplicat	Quantité < 10 copies	Quantité ≥ 10 000	Le pourcentage de P210 est x,xxxx % (P210 percentage is x.xxxx%)	<b>L'ARN de P210 a été détecté.</b> La valeur % P210 calculée s'affiche.
2 <sup>e</sup> réplicat	Non détecté	Quantité ≥ 10 000		
1 <sup>er</sup> réplicat	Quantité > 10 copies	Quantité ≥ 10 000		<b>L'ARN de P210 a été détecté mais le % P210 ne peut pas être calculé.</b> Les différences entre les quantités de P210 dans l'échantillon en double ne sont pas acceptables. Tester à nouveau l'échantillon.
2 <sup>e</sup> réplicat	Non détecté	Quantité ≥ 10 000	Non concluant - Tester à nouveau l'échantillon (Inconclusive - Retest Sample)	
1 <sup>er</sup> réplicat	Détecté ou Non détecté	Quantité < 10 000	Non valide - Tester à nouveau l'échantillon (Invalid - Retest Sample)	<b>L'ARN d'ABL est inférieur à la valeur seuil (10 000 copies).</b> Tester à nouveau l'échantillon.
2 <sup>e</sup> réplicat	Détecté ou Non détecté	Quantité ≥ 10 000		
1 <sup>er</sup> réplicat	DÉTECTÉ ou NON DÉTECTÉ	Quantité < 10 000	Non valide - Tester à nouveau l'échantillon (Invalid - Retest Sample)	<b>L'ARN d'ABL est inférieur à la valeur seuil (10 000 copies).</b> Tester à nouveau l'échantillon.
2 <sup>e</sup> réplicat	DÉTECTÉ ou NON DÉTECTÉ	Quantité < 10 000		

**Remarque :** si le résultat de la réaction d'amplification de P210 est < 3 copies/réaction pour un échantillon, la quantité rapportée sera de 3 copies/réaction.

Les échantillons rapportés comme « Non valide - Tester à nouveau l'échantillon » (Invalid - Retest Sample) par le logiciel ELITe InGenius ne sont pas appropriés pour l'interprétation des résultats car l'ARNm d'ABL n'a pas été efficacement détecté. Dans ce cas, des problèmes sont survenus pendant la phase d'extraction (perte d'ARN, présence d'inhibiteurs ou dégradation de l'ARN extrait – voir le chapitre « Problèmes et solutions ») pouvant entraîner des résultats incorrects et des faux négatifs. L'échantillon n'est pas adapté pour le calcul du % P210, le test est non valide et doit être répété sur l'ARN extrait en premier et, si un problème est confirmé, répété à partir de l'extraction d'un nouvel échantillon.

Les échantillons rapportés comme « Non concluant - Tester à nouveau l'échantillon » (Inconclusive - Retest Sample) par le logiciel ELITe InGenius ne sont pas appropriés pour l'interprétation des résultats car l'ARNm de P210 n'a pas été efficacement détecté. Dans ce cas, des problèmes sont survenus pendant la phase d'extraction (perte d'ARN, présence d'inhibiteurs ou dégradation de l'ARN extrait – voir le chapitre « Problèmes et solutions ») pouvant entraîner des résultats incorrects et des faux négatifs. L'échantillon n'est pas adapté pour le calcul du % P210, le test est non concluant et doit être répété sur l'ARN extrait en premier et, si un problème est confirmé, répété à partir de l'extraction d'un nouvel échantillon.

Les échantillons rapportés comme « ARN de P210 non détecté ou inférieur la LoD » (P210 RNA Not Detected or below LoD) sont appropriés pour l'analyse mais il n'a pas été possible de détecter l'ARN de P210. Dans ce cas, il n'est pas possible d'exclure le fait que de l'ARN soit présent à une concentration inférieure à la limite de détection du test (se reporter à la section « Caractéristiques de performance »).

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

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

#### D. Rapport des résultats des échantillons

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

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

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

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

## CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

### Limite de détection

La limite de détection de P210 du test avec l'ARN total a été vérifiée en utilisant le matériel de référence étalonné IVS10011 Clonal Control RNA (InVivoScribe, É.-U), de l'ARN total extrait d'une lignée cellulaire humaine positive pour BCR-ABL P210 b3a2 dilué dans l'ARN total d'une lignée cellulaire humaine négative pour la translocation. La dilution  $10^{-5}$  a été testée en 20 réplicats (300 ng d'ARN/réaction), en effectuant la réaction de transcription inverse et d'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. en association avec le système ELITe InGenius.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Limite de détection avec des échantillons d'ARN total et le système ELITe InGenius					
Échantillon	Dilution	N	Positif	Négatif	% P210
ARN de P210	$10^{-5}$	20	20	0	0,0025 %

Tous les réplicats se sont avérés être positifs pour P210, avec une concentration moyenne de % P210 égale à 0,0025 %. La quantité moyenne d'ABL enregistrée dans les tests pour la définition de la limite de détection était d'environ 100 000 copies par réaction.

### Plage de mesure linéaire

La plage de mesure linéaire de P210 de ce test avec l'ARN total a été déterminée en utilisant le panel de matériel étalonné de référence IVS10011 Clonal Control RNA (InVivoScribe, É.-U). Le panel est constitué d'ARN total extrait d'une lignée cellulaire humaine positive pour BCR-ABL P210 b3a2 dilué dans l'ARN total d'une lignée cellulaire humaine négative pour la translocation. Les dilutions utilisées allaient de l'ARN pur positif pour P210 (ARN de P210) à  $10^{-5}$  (étapes de dilution de 1 log). Chaque échantillon du panel a été testé en 4 réplicats (300 ng d'ARN/réaction), en effectuant la réaction de transcription inverse et d'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. en association avec le système ELITe InGenius. L'analyse statistique a été réalisée par une régression linéaire.

L'analyse des données obtenues a démontré que le test présentait une réponse linéaire pour les points de panel allant de l'ARN pur positif pour P210 à une dilution de  $10^{-5}$  avec un coefficient de corrélation linéaire supérieur à 0,99.

La limite supérieure de la mesure linéaire vérifiée dans ce test est l'ARN pur positif pour P210, correspondant à une concentration de % P210 égale à 100 %.

La limite inférieure de la mesure linéaire vérifiée dans ce test est la dilution de  $10^{-5}$ , égale à la limite de détection et correspondant à une concentration de % P210 égale à 0,0025 %.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Plage de mesure linéaire avec des échantillons d'ARN total et le système ELITe InGenius			
Échantillon	Nombre moyen de copies de P210/réaction	Nombre moyen de copies log. de P210/réaction	Écart-type
ARN de P210	474 505	5,676	0,02
Dilution à $10^{-1.0}$	37 516	4,574	0,02
Dilution à $10^{-2.0}$	3 545	3,549	0,02
Dilution à $10^{-3.0}$	308	2,484	0,07
Dilution à $10^{-4.0}$	36	1,553	0,06
Dilution à $10^{-5.0}$	3	0,365	0,33

La quantité moyenne d'ABL enregistrée dans les tests était d'environ 150 000 copies par réaction.

**Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs**

La sensibilité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons cliniques positifs, a été testée en analysant un panel d'échantillons cliniques positifs pour P210.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant 33 échantillons de sang périphérique frais prélevé sur EDTA chez des patients leucémiques testés positifs pour la translocation de BCR-ABL, variant P210, par un produit d'amplification en temps réel portant le marquage CE-DIV. Chaque échantillon a été testé avec le système **ELITe InGenius** en mode « Extraction + PCR » (Extract + PCR).

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant :

Échantillons	N	positifs	négatifs	non valides
Échantillons de sang périphérique positifs pour P210	33	32	1	0

Dans le test, 32 échantillons sur 33 ont été confirmés et un échantillon a généré un résultat négatif discordant. Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'analyse était de 97 %.

La quantité moyenne d'ABL enregistrée dans les tests était d'environ 60 000 copies par réaction.

**Spécificité diagnostique : confirmation des échantillons négatifs**

La spécificité diagnostique du test, en tant que confirmation des échantillons négatifs, a été évaluée en analysant un panel d'échantillons cliniques négatifs pour P210.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant 41 échantillons de sang périphérique frais prélevé sur EDTA chez différents sujets testés négatifs pour la translocation de BCR-ABL, variant P210, par un produit d'amplification en temps réel portant le marquage CE-DIV. Chaque échantillon a été testé avec le système **ELITe InGenius** en mode « Extraction + PCR » (Extract + PCR).

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant :

Échantillons	N	positifs	négatifs	non valides
Échantillons de sang périphérique négatifs pour P210	41	2	39	0

Dans le test, 39 échantillons sur 41 ont été confirmés et deux échantillons ont généré un résultat positif discordant. Dans ce test, la spécificité diagnostique de l'analyse était de 95,1 %.

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

**Remarque :** les données complètes et les résultats des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit avec les matrices et les instruments sont enregistrés dans le fichier technique du produit « BCR-ABL P210 ELITe MGB® Kit », FTP RTSG07PLD210.

**ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**  
**ABI 7300 Real-Time System**

**ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES**

**Échantillons**

Ce produit doit être utilisé avec l'**ARN extrait** des échantillons cliniques suivants : suspensions lymphomonocytaires et leucocytaires provenant du sang périphérique collecté en EDTA ou citrate de sodium, sang médullaire collecté en EDTA ou citrate de sodium.

Ce produit doit être utilisé en ajoutant de 300 ng jusqu'à 1.5 µg d'**ARN extrait** à la réaction de transcription inverse et d'amplification en temps réel.

Suspensions lymphomonocytaires et leucocytaires.

Les suspensions lymphomonocytaires ou leucocytaires (p. ex., provenant de la couche leucoplaquettaire) utilisées pour l'extraction de l'ARN doivent être préparées à partir d'échantillons cliniques de sang périphérique ou sang médullaire conformément aux directives du laboratoire, remises en suspension dans une solution physiologique stérile ou du PBS stérile, et conservées à +2/8 C pendant un maximum de quatre heures.

La quantité optimale de lymphomonocytes ou de leucocytes à partir de laquelle l'ARN total est extrait est d'environ 10.000.000 cellules.

Ne pas congeler les suspensions de lymphomonocytes ou de leucocytes afin d'éviter la dégradation de l'ARN.

Le sang périphérique collecté en EDTA ou citrate de sodium ou le sang médullaire collecté en EDTA ou citrate de sodium, utilisé pour la préparation de lymphomonocytes ou de leucocytes, doit être collecté conformément aux directives du laboratoire, transporté à +2/8 C et conservé à +2/8 C pendant un maximum de quatre heures.

Ne pas congeler le sang périphérique ou médullaire afin d'éviter la dégradation de l'ARN.

**Substances interférentes**

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

Des quantités d'ARN supérieures à 1.5 µg par réaction pourraient inhiber la réaction de transcription inverse et l'amplification en temps réel.

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

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

**Contrôles d'amplification**

Il est absolument indispensable de valider chaque session d'amplification avec un contrôle de réaction négatif et un contrôle de réaction positif.

Utiliser de l'eau de qualité biologie moléculaire (non fournie avec le produit) en tant que contrôle négatif (NC). Cet ajout à la réaction doit remplacer l'ajout d'ARN extrait de l'échantillon.

Utiliser le produit «**BCR ABL P210 ELITe Standard**» en tant que contrôle positif.

**Contrôles de qualité**

Il est recommandé de valider l'ensemble de la procédure d'analyse de chaque session d'extraction, de transcription inverse et d'amplification en traitant un échantillon négatif et un échantillon positif préalablement testés, ou un matériau étalonné de référence.



**Remarque :** afin de déterminer le titrage en ARN de l'échantillon de départ, préparer deux séries de réactions à l'aide du produit **Q - PCR standard** pour obtenir les deux **courbes d'étalonnage** – l'une pour P210 (10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>1</sup> copies / réaction) et l'autre pour ABL (10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup> copies / réaction).

**Remarque :** afin d'optimiser l'utilisation du produit, la courbe d'étalonnage pour P210 peut être déterminée en omettant le niveau 10<sup>1</sup> copies / réaction du produit Q - PCR Standard et en utilisant les autres 4 niveaux du produit Q - PCR Standard (10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> copies / réaction) ou en utilisant le niveau 10<sup>1</sup> copies / réaction du produit Q - PCR Standard et en omettant le niveau 10<sup>3</sup> copies / réaction du produit Q - PCR Standard (10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>1</sup> copies / réaction).

**Remarque :** calculer, pour la cible P210 et le contrôle ABL, deux puits pour chaque échantillon à analyser (S), deux puits pour l'amplification du contrôle négatif (NC) et deux puits pour chaque produit Q-PCR Standard (5 ou 4 points pour P210 et 3 points pour ABL).

La configuration de l'analyse quantitative de 6 échantillons est présentée, à titre d'exemple, dans le paragraphe précédent en décrivant la procédure pour les instruments **7300 Real Time PCR System** et **7900 Real Time PCR System**.

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

- ajouter à l'étape d'amplification une étape (Étape d'ajout [Add Step]) pour une **extension à 72 C**;

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

- modifier le temps comme indiqué dans le tableau «**Cycle thermique**» (Thermal cycle);
- régler le numéro de cycle sur **45**;
- régler le volume de réaction sur **30 µl**.

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

#### Préparation de l'amplification

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

Avant de commencer la session, il est important de procéder comme suit:

- vérifier la disponibilité des réactifs requis pour chaque échantillon à analyser (voir le tableau page 10).
- sortir et décongeler à température ambiante (+18/25 C) les tubes à essai contenant les échantillons d'ARN à analyser. Agiter les tubes au vortex pendant 5 secondes, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace;
- sortir et décongeler à température ambiante (+18/25 C) pendant 30 minutes les tubes à essai des mélanges **P210 PreMix** (capuchon BLANC) et **ABL PreMix** (capuchon NEUTRE) nécessaires à la session d'analyse. Se rappeler que le contenu de chaque tube à essai est suffisant pour effectuer **50 réactions**. Agiter les tubes au vortex à trois reprises pendant 10 secondes, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace;
- sortir et décongeler à température ambiante (+18/25 C) pendant 30 minutes les tubes à essai contenant le mélange **PCR MasterMix** (capuchon NEUTRE) nécessaires à la session analytique. Se rappeler que le contenu de chaque tube à essai est suffisant pour effectuer jusqu'à **50** réactions. Agiter les tubes au vortex à trois reprises pendant 10 secondes, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace;

- retirer les tubes de **RT EnzymeMix** (capuchon NOIR) nécessaires à la session analytique, en se rappelant que le contenu de chaque tube est suffisant pour effectuer **50 réactions**. Centrifuger pendant 5 secondes pour amener le contenu au fond et conserver sur de la glace;

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

- sortir et décongeler à température ambiante (+18/25 C) pendant 30 minutes les tubes de **P210-ABL Q-PCR Standard** nécessaires à la session analytique (**pour les deux réactions P210 et ABL**). Se rappeler que le contenu de chaque tube à essai est suffisant pour effectuer jusqu'à **8 réactions**. Agiter les tubes au vortex à trois reprises pendant 10 secondes, centrifuger le contenu pendant 5 secondes puis conserver les tubes sur de la glace;

- se munir de la **microplaque d'amplification** qui sera utilisée pendant la session, en prenant soin de la manipuler avec des gants sans poudre et de ne pas endommager les puits.

- se munir de la **feuille de scellement d'amplification** qui sera utilisée pendant la session, en prenant soin de la manipuler avec des gants sans poudre et de ne pas l'endommager.

- préparer deux tubes en polypropylène stériles de 1,5 ml (non fournis avec ce produit): l'un pour le mélange réactionnel complet de **P210**, l'autre pour le mélange réactionnel complet **ABL**, et les marquer de manière reconnaissable avec un marqueur permanent;

- préparer deux mélanges réactionnels complets, l'un pour **P210**, l'autre pour **ABL**, en utilisant les trois composants fournis dans le produit, en fonction du nombre d'échantillons à analyser, comme décrit dans le tableau suivant.

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

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

Agiter les deux mélanges réactionnels complets au vortex à trois reprises pendant 10 secondes, centrifuger le contenu pendant 5 secondes et conserver les tubes sur de la glace;

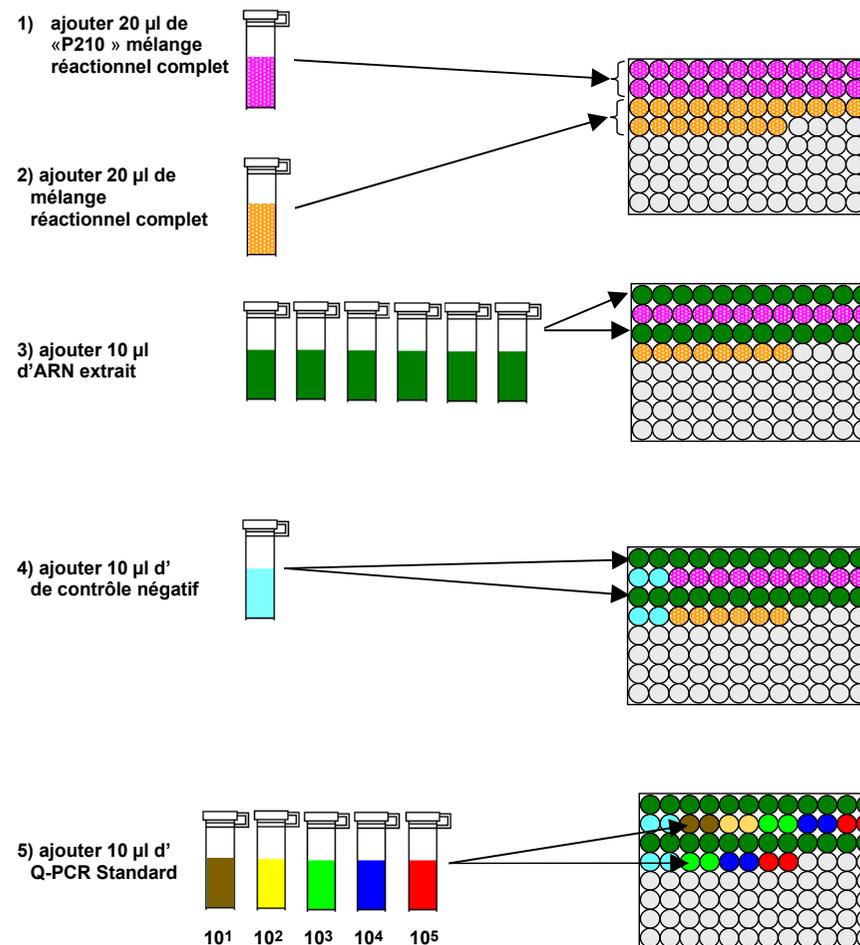
**Remarque:** les mélanges réactionnels complets préparés doivent être utilisés dans 1 heure. Les mélanges réactionnels préparés ne **peuvent pas** être stockés.

Configurer les **réactions P210 et ABL** comme décrit ci-dessous en veillant à maintenir la **microplaque d'amplification** dans un bloc froid (~ + 5 °C) ou sur de la glace.

1. Pipeter avec précision **20 µl** de **mélange réactionnel complet «P210»** dans le fond des **puits de la microplaque d'amplification de «P210»**, comme indiqué précédemment dans la **Fiche de travail** (Work Sheet). Éviter de créer des bulles.
2. Pipeter avec précision **20 µl** de **mélange réactionnel complet «ABL»** dans le fond des puits de la **microplaque à amplification de «ABL»**, comme indiqué précédemment dans la **Fiche de travail** (Work Sheet). Éviter de créer des bulles.
3. Pipeter avec précision **10 µl** d'**ARN extrait** dans le mélange réactionnel complet du premier échantillon dans les deux puits correspondants à **«P210»** et dans les deux puits correspondants à **«ABL»** de la **microplaque à amplification**, comme indiqué précédemment dans la **Fiche de travail** (Work Sheet). Bien mélanger l'échantillon en pipetant à trois reprises l'**ARN extrait** dans le mélange réactionnel complet. Éviter de créer des bulles à la fois au fond du puits et en surface. Procéder de la même manière avec tous les autres échantillons d'**ARN extrait**.
4. Pipeter avec précision **10 µl** d'**eau de qualité biologie moléculaire** (non fournie avec ce produit) dans le mélange réactionnel complet dans les deux puits correspondants à **«P210»** et dans les deux puits correspondants à **«ABL»** de la **microplaque d'amplification**, comme indiqué précédemment dans la **Fiche de travail** (Work Sheet). Bien mélanger le standard en pipetant à trois reprises le **P210-ABL Q-PCR Standard** dans le mélange réactionnel complet. Éviter de créer des bulles à la fois au fond du puits et en surface. Procéder de la même manière avec les autres standards **P210-ABL Q-PCR Standards**.
5. Pipeter avec précision, **10 µl** du premier étalon **P210-ABL Q-PCR Standard** dans le mélange réactionnel complet dans les deux puits correspondants à **«ABL»** de la **microplaque d'amplification**, comme indiqué précédemment dans la **Fiche de travail** (Work Sheet). Bien mélanger le standard en pipetant à trois reprises le **P210-ABL Q-PCR Standard** dans le mélange réactionnel complet. Éviter de créer des bulles à la fois au fond du puits et en surface. Procéder de la même manière avec les autres standards **P210-ABL Q-PCR**.
7. Sceller avec précision la **microplaque d'amplification** avec la **feuille de scellement d'amplification**.
8. Transférer la **microplaque d'amplification** dans le thermocycleur en temps réel dans la zone d'amplification/de détection, et lancer le cycle thermique d'amplification en enregistrant le réglage de la session avec un nom de fichier univoque et reconnaissable (p. ex., «année-mois-jour-BCR-ABL-P210-EGSpA»).

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

La figure suivante présente la configuration des réactions d'amplification en temps réel et de la transcription inverse pour P210 et ABL.



### Analyse des résultats

Les valeurs de fluorescence émises par la sonde spécifique de P210 (détecteur FAM «P210») dans la réaction d'amplification P210 et par la sonde spécifique à ABL (détecteur FAM «ABL») dans la réaction d'amplification d'ABL doivent être analysées par le logiciel de l'instrument.

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

- définir manuellement (Résultats [Results] > Tracé d'amplification [Amplification plot] > delta Rn vs Cycle [delta Rn vs Cycle]) la plage de calcul du **niveau de fond de fluorescence (Référence)** (fluorescence background level [Baseline]) du cycle 6 au cycle 15 ;

**Remarque** : dans le cas d'un échantillon positif présentant un titrage élevé de P210 ou d'ABL, la fluorescence FAM de la sonde spécifique pour P210 ou ABL peut commencer à augmenter avant le 15<sup>e</sup> cycle. Dans ce cas, la plage de calcul pour la «référence» doit être définie pour les deux détecteurs du cycle 6 au cycle dans lequel la fluorescence FAM commence à augmenter, comme détecté par le logiciel de l'instrument (Résultats [Results] > Composant [Component]).

- régler manuellement le **Seuil** (Threshold) pour le détecteur FAM «P210» sur **0,1**;
- régler manuellement le **Seuil** (Threshold) pour le détecteur FAM «ABL» sur **0,1**;

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

### Courbe d'étalonnage

Dans le cas de la réaction d'amplification de P210 et ABL des étalons **Q-PCR Standards**, les valeurs **Ct de P210 et ABL** sont utilisées pour calculer les deux **courbes d'étalonnage** (Résultats [Results] > Courbe d'étalonnage [Standard Curve]) de la session d'amplification et pour valider l'amplification et la détection comme indiqué dans le tableau suivant:

Réaction P210 - Q – PCR Standard 10 <sup>5</sup> détecteur FAM «P210»	Résultat d'analyse	Amplification/Détection
Ct ≤ 25	POSITIF	CORRECT
Réaction P210 - Courbe d'étalonnage détecteur FAM «P210»	Plage d'acceptation	Amplification/Détection
Coefficient de corrélation (R2)	0,970 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRECT
Réaction ABL - PCR Standard 10 <sup>5</sup> détecteur FAM «ABL»	Résultat d'analyse	Amplification/Détection
Ct ≤ 25	POSITIF	CORRECT
Réaction ABL - Courbe d'étalonnage détecteur FAM «ABL»	Plage d'acceptation	Amplification/Détection
Coefficient de corrélation (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRECT

**\*Remarque** : Si la courbe d'étalonnage pour P210 a été préparée en omettant l'étalon Q - PCR Standard 10<sup>1</sup> copies / réaction, la plage d'acceptation du coefficient de détermination sera de 0,990 ≤ R2 ≤ 1,000.

Si le résultat de la réaction d'amplification avec **Q - PCR Standard 10<sup>5</sup>** est **Ct > 25** ou **Ct indéterminé** (Ct Undetermined) ou si la valeur du **coefficient de détermination** (determination coefficient) (**R2**) ne se situe pas dans les limites, l'ADN cible n'a pas été correctement détecté. Cela signifie que des problèmes sont apparus pendant l'amplification ou la détection (préparation incorrecte du mélange réactionnel complet, distribution incorrecte du mélange réactionnel complet ou des étalons, dégradation de la sonde ou des étalons, réglage incorrect de la position des étalons, réglage incorrect du cycle thermique ; se reporter au chapitre «Problèmes et solutions», ce qui peut entraîner des résultats incorrects. La session analytique n'est pas valide et doit être répétée en commençant par l'étape d'amplification.

### Contrôle négatif

Dans le cas de la réaction d'amplification de P210 et ABL du **contrôle négatif** (Negative Control), les valeurs **Ct de P210 et ABL** (Résultats [Results] > Rapport [Report]) sont utilisées pour valider l'amplification et la détection, comme indiqué dans le tableau suivant:

Réaction P210 - Contrôle négatif détecteur FAM «P210»	Résultat d'analyse	Amplification/Détection
Ct Indéterminé	NÉGATIF	CORRECT
Réaction ABL - Contrôle négatif détecteur FAM «ABL»	Résultat d'analyse	Amplification/Détection
Ct Indéterminé ou Ct > 35	NÉGATIF	CORRECT

Si le résultat de la réaction d'amplification du **contrôle négatif** est différent de **Ct indéterminé** (Ct Undetermined) pour P210 et ABL, cela signifie que l'ADN cible a été détecté dans la réaction d'amplification. Des problèmes sont survenus pendant la phase d'amplification (contamination, préparation incorrecte du mélange réactionnel complet, dégradation de la sonde, réglage incorrect de la position du contrôle négatif, réglage incorrect du cycle thermique; se reporter au chapitre «Problèmes et solutions») pouvant entraîner des résultats incorrects et des faux positifs. La session analytique n'est pas valide et doit être répétée en commençant par la phase d'amplification.

### Échantillons

Dans le cas des réactions d'amplification de chaque **échantillon**, les valeurs **Ct de P210** (P210 Ct) sont utilisées pour détecter et quantifier la présence d'ARNm cible, tandis que les valeurs **Ct de ABL** (ABL Ct) sont utilisées pour détecter et quantifier la présence d'ARNm de contrôle (validation de l'extraction et normalisation de la cible).

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

Les valeurs **Ct de P210** (P210 Ct) et **Ct de ABL** (ABL Ct) dans les réactions d'amplification de chaque **échantillon** et les **courbes d'étalonnage** de la session d'amplification sont utilisées pour calculer la **quantité d'ARNm** de P210 et ABL présente dans les réactions d'amplification des échantillons.

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

Les **quantités** issues des réactions d'amplification de **P210** et **ABL** pour les doubles de chaque **échantillon** (Résultats [Results] > Rapport [Report]) sont analysées comme décrit dans le tableau suivant, qui présente les différents cas pouvant se produire lors d'une session d'amplification, ainsi que l'approche recommandée pour évaluer les données :

Échantillon	ARNm de P210	ARNm d'ABL*	Quantité calculée d'ARNm de P210	Quantité calculée d'ARNm d'ABL
1 <sup>er</sup> réplicat	DÉTECTÉ	Quantité ≥ 10.000	Quantité totale	Quantité totale
2 <sup>e</sup> réplicat	DÉTECTÉ	Quantité ≥ 10.000		
1 <sup>er</sup> réplicat	NON DÉTECTÉ	Quantité ≥ 10.000	0	Quantité totale
2 <sup>e</sup> réplicat	NON DÉTECTÉ	Quantité ≥ 10.000		
1 <sup>er</sup> réplicat	Quantité < 10 copies	Quantité ≥ 10.000	Quantité	Quantité totale
2 <sup>e</sup> réplicat	NON DÉTECTÉ	Quantité ≥ 10.000		
1 <sup>er</sup> réplicat	Quantité > 10 copies	Quantité ≥ 10.000	Retester l'échantillon	
2 <sup>e</sup> réplicat	NON DÉTECTÉ	Quantité ≥ 10.000		
1 <sup>er</sup> réplicat	DÉTECTÉ ou NON DÉTECTÉ	Quantité < 10.000	Retester l'échantillon	
2 <sup>e</sup> réplicat	DÉTECTÉ ou NON DÉTECTÉ	Quantité ≥ 10.000		
1 <sup>er</sup> réplicat	DÉTECTÉ ou NON DÉTECTÉ	Quantité < 10.000	Retester l'échantillon	
2 <sup>e</sup> réplicat	DÉTECTÉ ou NON DÉTECTÉ	Quantité < 10.000		

\* **Remarque** : Si le résultat des réactions d'amplification d'ABL d'un échantillon est **Quantité d'ABL < 10.000** (ABL Quantity < 10.000) ou **ABL NON DETECTÉ** (ABL NOT DETECTED) pour au moins un des deux réplicats, cela signifie que l'ARNm d'ABL n'a pas été détecté efficacement. Dans ce cas, des problèmes sont apparus pendant la phase d'extraction (perte d'ARN, présence d'inhibiteurs ou dégradation de l'ARN extrait – se reporter au chapitre «Problèmes et solutions») pouvant entraîner des résultats incorrects et des faux négatifs.

**Remarque** : Si le résultat des réactions d'amplification d'un échantillon est **P210 NON DÉTECTÉ** (P210 NOT DETECTED) et **Quantité d'ABL < 10.000** (ABL Quantity < 10.000) ou **ABL NON DÉTECTÉ** (ABL NOT DETECTED) pour au moins un des deux réplicats, le résultat de l'analyse est non valide et l'échantillon n'est pas approprié. Le test doit être répété sur l'ARN extrait en premier et, si le problème est confirmé, répéter à partir de l'extraction d'un nouvel échantillon.

**Remarque** : Si le résultat des réactions d'amplification d'un échantillon est **P210 DÉTECTÉ** (P210 DETECTED) et **Quantité d'ABL < 10.000** (ABL Quantity < 10.000) ou **ABL NON DÉTECTÉ** (ABL NOT DETECTED) pour au moins un des deux réplicats, le résultat de l'analyse est valide et l'échantillon est positif pour l'ARNm de P210. Dans ce cas, cependant, il n'est pas possible d'effectuer l'analyse quantitative. Le test doit être répété sur l'ARN extrait en premier et, si le problème est confirmé, répéter à partir de l'extraction d'un nouvel échantillon.

**Remarque** : Si le résultat de la réaction d'amplification d'un échantillon est **P210 NON DÉTECTÉ** (P210 NOT DETECTED) et **Quantité d'ABL ≥ 10.000** (ABL Quantity ≥ 10.000) pour les deux réplicats, cela signifie que l'ARNm de P210 n'a pas été détecté dans l'ARN obtenu à partir de l'échantillon, mais qu'il n'est pas possible d'exclure la présence d'ARNm de P210 à un titrage inférieur à la limite de détection du produit (se reporter au chapitre «Caractéristiques de performance»). Dans ce cas, le résultat serait un faux négatif.

**Remarque** : Si le résultat de la réaction d'amplification d'un échantillon est **Quantité de P210 > 10.000 copies** (P210 Quantity > 10.000) pour un réplicat et **P210 NON DÉTECTÉ** (P210 NOT DETECTED) pour l'autre réplicat et **Quantité d'ABL ≥ 10.000** (ABL Quantity ≥ 10.000) pour les deux réplicats, cela signifie que l'ARNm de P210 n'a pas été correctement détecté dans l'ARN obtenu à partir de l'échantillon. Le résultat de l'analyse est valide et l'échantillon est positif pour l'ARNm de P210. Dans ce cas, cependant, il n'est pas possible d'effectuer l'analyse quantitative. Le test doit être répété sur l'ARN extrait en premier et, si le problème est confirmé, répéter à partir de l'extraction d'un nouvel échantillon.

Lorsque le résultat de la réaction d'amplification d'un échantillon est **P210 DÉTECTÉ** (P210 DETECTED) et que le résultat de la réaction d'amplification est **Quantité d'ABL ≥ 10.000** (ABL Quantity ≥ 10.000), cela signifie que le résultat de l'analyse est valide, que l'échantillon est positif pour l'ARNm de P210, et qu'il est possible de réaliser l'analyse quantitative.

Les **quantités calculées d'ARNm de P210 et d'ABL** (calculated Quantities of P210 and ABL mRNA) de chaque échantillon sont utilisées pour calculer le pourcentage de copies d'ARNm de P210 normalisées en fonction du nombre de copies d'ARNm d'ABL (**% P210**) dans l'échantillon de départ selon la formule suivante:

$$\% \text{ P210} = \frac{\text{Quantité calculée d'ARNm de P210}}{\text{Quantité calculée d'ARNm d'ABL}} \times 100$$

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

### CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

#### Limite de détection (LoD)

La limite de détection du gène P210 de l'analyse avec l'ARN total a été déterminée en utilisant un panel de dilutions préparées à partir du matériel de référence étaloné IVS10011 Clonal Control RNA (InVivoScribe, É.-U.). Le panel est constitué d'ARN total extrait d'une lignée cellulaire humaine positive pour BCR-ABL P210 b3a2 dilué dans l'ARN total d'une lignée cellulaire humaine négative pour la translocation. Les dilutions utilisées variaient de 10<sup>-3.5</sup> à 10<sup>-6</sup> (0,5 étape de dilution logarithmique). Chaque échantillon du panel a été testé dans 24 réplicats (300 ng d'ARN/réaction), en effectuant la réaction de transcription inverse et d'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. en association avec l'instrument de PCR en temps réel 7500 Fast Dx (Applied Biosystems). L'analyse statistique a été réalisée par une analyse de régression des probits des données (SPSS 12.0.1). La limite de détection a été définie comme la dilution à laquelle la probabilité d'obtenir un résultat positif est égale à 95 %.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Limite de détection avec des échantillons d'ARN totaux			
		Intervalle de confiance à 95 %	
		Limite inférieure	Limite supérieure
<b>95 % de positivité</b>	%P210 0,0016 % (dilution à 10 <sup>-5.0</sup> )	(dilution à 10 <sup>-5.2</sup> )	(dilution à 10 <sup>-4.7</sup> )

La limite de détection a été définie à une dilution à 10<sup>-5</sup> correspondant à une concentration de %P210 égale à 0,0018 %. La quantité moyenne d'ABL enregistrée dans les tests pour la définition de la limite de détection était d'environ 200.000 copies par réaction.

**Plage de mesure linéaire**

La plage de mesure linéaire P210 de cette analyse avec l'ARN total a été déterminée en utilisant le panel de matériau étalonné de référence «IVS10011 Clonal Control RNA» (InVivoScribe, É.-U.). Le panel est constitué d'ARN total extrait d'une lignée cellulaire humaine positive pour BCR-ABL P210 b3a2 dilué dans l'ARN total d'une lignée cellulaire humaine négative pour la translocation. Les dilutions utilisées allaient de l'ARN pur positif pour le P210 (ARN du P210) à 10<sup>-6</sup> (1 étape de dilution logarithmique). Chaque échantillon du panel a été testé dans 24 réplicats (300 ng d'ARN/réaction), en effectuant la réaction de transcription inverse et d'amplification à l'aide des produits ELITechGroup S.p.A. en association avec l'instrument de PCR en temps réel 7500 Fast Dx (Applied Biosystems). L'analyse statistique a été réalisée par régression linéaire (SigmaPlot 9.0).

L'analyse des données obtenues a démontré que l'analyse présentait une réponse linéaire pour les points de panel allant de l'ARN pur positif pour le P210 à une dilution à 10<sup>-5</sup> avec un coefficient de corrélation linéaire supérieur à 0,99.

La limite supérieure de la mesure linéaire vérifiée dans ce test est l'ARN pur positif pour le P210, correspondant à une concentration de %P210 égale à 82,5 %.

La limite inférieure de la mesure linéaire vérifiée dans ce test est la dilution à 10<sup>-5</sup>, égale à la limite de détection et correspondant à une concentration de %P210 égale à 0,0016 %.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Plage de mesure linéaire avec échantillons d'ARN total			
Échantillon	Moyenne de P210 copies/réaction	Moyenne de copies log. de P210/réaction	Écart-type
ARN de P210	358 276,92	5,55	0,04
dilution à 10 <sup>-1.0</sup>	40 903,93	4,61	0,04
dilution à 10 <sup>-2.0</sup>	4 150,86	3,62	0,04
dilution à 10 <sup>-3.0</sup>	520,36	2,71	0,07
dilution à 10 <sup>-4.0</sup>	59,02	1,76	0,11
dilution à 10 <sup>-5.0</sup>	4,81	0,58	0,32

La quantité moyenne d'ABL enregistrée dans les tests pour la définition de la plage de mesure linéaire était d'environ 320 000 copies par réaction.

Les quantités mesurées de P210 et d'ABL ont été vérifiées à l'aide du matériau de référence certifié européen ERM®-AD623 (IRMM, Belgique). Le matériel consiste en un panel de dilution (1,0 étape de dilution logarithmique) d'ADN plasmidique contenant les produits d'amplification de P210 et d'ABL. La concentration en ADN plasmidique a été calculée par la méthode de PCR numérique. Les dilutions utilisées allaient de 10<sup>6</sup> copies/µl à 10<sup>1</sup> copies/µl. Chaque échantillon du panel a été testé dans 9 réplicats en effectuant la réaction d'amplification avec les produits ELITechGroup S.p.A. «BCR-ABL P210 ELITe MGB® Kit» et «BCR-ABL P210 ELITe Standard», en association avec l'instrument de PCR en temps réel 7500 Fast Dx (Applied Biosystems).

L'analyse des données, réalisée conformément aux recommandations de l'IRMM, a montré que la mesure du matériau de référence certifié obtenue avec les produits ELITechGroup S.p.A. est dans les limites de l'incertitude de mesure pour des quantités allant de 10<sup>6</sup> copies/µl à 10<sup>1</sup> copies/µl (équivalent à 10 000 000 copies par réaction et à 100 copies par réaction, à raison de 10 µl par réaction) pour la cible P210 et allant de 10<sup>6</sup> copies/µl à 10<sup>2</sup> copies/µl (équivalent à 10 000 000 copies par réaction et à 1000 copies par réaction, à raison de 10 µl par réaction) pour la cible ABL.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant.

Alignement de la mesure de P210 sur le matériau de référence européen ERM®-AD623		
Copies certifiées/µl	Copies mesurées/µl	Écart-type
1 080 000	1 268 750	193 866
108 000	113 273	109 676
10 300	11 375	1 899
1 020	1 021	93
104	106	20
10,0	9,1	1,3

Alignement de la mesure d'ABL sur le matériau de référence européen ERM®-AD623		
Copies certifiées/µl	Copies mesurées/µl	Écart-type
1 080 000	1 355 000	197 990
108 000	129 250	12 7811
10 300	13 427	1 843
1 020	1 150	140
104	116	17

**Efficacité de détection et de quantification des polymorphismes possibles**

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

La vérification des régions d'hybridation des oligonucléotides des amorces et des sondes fluorescentes (P210 et ABL) par alignement sur les séquences des gènes humains P210 et ABL disponibles dans la base de données a montré leur préservation et l'absence de mutations significatives.

**Sensibilité diagnostique : confirmation des échantillons positifs**

La sensibilité diagnostique de l'analyse, confirmant la présence d'échantillons cliniques positifs, a été testée en analysant un panel d'échantillons cliniques positifs pour le gène P210.

La sensibilité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériau de référence 49 échantillons d'ARN archivés extraits de sang périphérique prélevé sur EDTA provenant de patients atteints de leucémie, testés positifs pour le P210 par un produit d'amplification en temps réel CE-IVD. Les échantillons ont été extraits à l'aide d'une méthode validée dans le laboratoire de référence. Les réactions de transcription inverse et d'amplification de l'ARN total extrait (300 ng/réaction) ont été réalisées avec les produits ELITechGroup S.p.A sur l'instrument de PCR en temps réel 7500 Fast Dx.

Les résultats finaux sont présentés dans le tableau suivant:

Échantillons	N.	positifs	négatifs	
ARN positif pour P210 à partir d'échantillons de sang total sur EDTA	49	49	0	

Dans ce test, la sensibilité diagnostique de l'essai était égale à 100%.

Les résultats du test ABL Qty pour les échantillons de sang périphérique ou sang médullaire étaient tous supérieurs à 40 000 copies/réaction.

#### Spécificité diagnostique: confirmation des échantillons négatifs

La spécificité diagnostique de l'analyse, en termes de confirmation des échantillons cliniques négatifs, a été évaluée en analysant un panel d'échantillons cliniques négatifs pour le P210.

La spécificité diagnostique a été évaluée en utilisant comme matériau de référence 31 échantillons d'ARN archivés extraits de sang périphérique prélevé sur EDTA provenant de donneurs sains supposés négatifs pour le P210. Les échantillons ont été extraits à l'aide d'une méthode validée dans le laboratoire de référence. Les réactions de transcription inverse et d'amplification de l'ARN total extrait (300 ng/réaction) ont été réalisées avec les produits ELITechGroup S.p.A sur l'instrument de PCR en temps réel 7500 Fast Dx.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillons	N.	positifs	négatifs	
ARN négatif pour P210 à partir d'échantillons de sang total sur EDTA	31	0	31	

Dans ce test, la spécificité diagnostique de l'essai était égale à 100%.

Les résultats du test ABL Qty pour les échantillons de sang périphérique ou sang médullaire étaient tous supérieurs à 20 000 copies/réaction.

**Remarque :** les données complètes et les résultats des tests effectués pour évaluer les caractéristiques de performance du produit avec les matrices et les instruments sont enregistrés dans le dossier technique du produit «BCR-ABL P210 ELITe MGB® Kit», FTP RTSG07PLD210.

#### BIBLIOGRAPHIE

- J. Gabert et al. (2003) *Leukemia* 17: 2318 - 2357  
E. Beillard et al. (2003) *Leukemia* 17: 2474 - 2486  
M. Baccarani et al. (2013) *Blood*: 122: 827 – 884  
N. C. P. 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

#### LIMITES DE LA PROCÉDURE

Utiliser uniquement de l'ARN extrait à l'aide de ce produit, issu des échantillons cliniques suivants: sang périphérique prélevé sur EDTA ou sur citrate, sang médullaire prélevé sur EDTA ou sur citrate, suspensions lymphomonocytaires (séparation Ficoll®) ou suspensions leucocytaires (provenant de la couche leuco-plaquettaire).

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

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

Des quantités d'ARN supérieures à 1.5 µg par réaction pourraient inhiber la réaction de transcription inverse et la réaction d'amplification des acides nucléiques.

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

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

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

En raison de sa grande sensibilité analytique, l'analyse d'amplification en temps réel des acides nucléiques utilisés dans ce produit est sujette à la contamination par des échantillons cliniques positifs pour P210, des contrôles positifs et des produits de réaction d'amplification eux-mêmes. La contamination conduit à l'obtention de résultats faux positifs. Le produit a été conçu de manière à réduire la contamination. Néanmoins, ce phénomène ne peut être évité qu'en suivant les bonnes pratiques de laboratoire et en respectant scrupuleusement les instructions fournies dans ce manuel.

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

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

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

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

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

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

Un résultat négatif obtenu avec ce produit signifie que l'ARNm de P210 n'est pas détecté dans la réaction de transcription inverse à partir de l'ADN extrait de l'échantillon. Cependant, il ne peut pas être exclu que l'ARNm de P210 ait un titrage inférieur à la limite de détection du produit (se reporter au chapitre «Caractéristiques de performance»). Dans ce cas, le résultat pourrait être un faux négatif.

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

Des polymorphismes possibles dans les régions du génome du patient couvertes par les amorces et les sondes du produit peuvent nuire à la détection et à la quantification d'ARNm de P210 et d'ARNm d'ABL.

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

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

**PROBLÈMES ET SOLUTIONS**

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

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

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

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

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

**LÉGENDE DES SYMBOLES**

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

**NOTE POUR L'ACQUÉREUR: LICENCE LIMITÉE**

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

Les réactifs de détection ELITe MGB® sont couverts par un ou plusieurs des brevets américains numéros 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,969,003, RE 38,416 et par les brevets EP numéros 0819133, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939, ainsi que par des demandes de brevet actuellement en instance.

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

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



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

## A. Intended use

The «BCR-ABL P210 ELITE MGB® Kit» product is a qualitative and quantitative, reverse transcription and amplification of nucleic acids assay for the detection of the mRNA of the BCR-ABL rearrangement, t(9;22) translocation, Philadelphia chromosome, variant P210 (P210) and for the quantification of the mRNA of P210 compared with the mRNA of the gene codifying the kinase protein Abelson (ABL). The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius®**.

## B. Amplified sequence

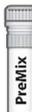
Target	Gene	Fluorophore
Control	BCR-ABL (variant P210 b3a2 and P210 b2a2)	FAM
	ABL (exons a2a3)	FAM

## C. Validated matrix

- › **PBL isolated by buffycoat\***

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

## D. Kit content

P210 PreMix	ABL PreMix	PCR Master Mix	RT Enzyme Mix*
			
1 tube of 270 µL 36 reactions 6 freeze-thaw cycles <b>WHITE CAP</b>	1 tube of 270 µL 36 reactions 6 freeze-thaw cycles <b>NEUTRAL CAP</b>	2 tubes of 820 µL 36 reactions 6 freeze-thaw cycles per tube <b>NEUTRAL CAP</b>	2 tubes of 20 µL 36 reactions 6 freeze-thaw cycles per tube <b>BLACK CAP</b>

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

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

## E. Material required not provided in the kit

- › **ELITE InGenius instrument:** INT030
- › **ELITE InGenius SP RNA:** INT034SPRNA
- › **ELITE InGenius DNase I:** INT034DNASE
- › **Dnase Tube Adapter Kit:** G6431-000
- › **Cell Lysis Solution Promega\*:** A7933
- › **RNA Lysis Buffer Promega\*:** Z3051
- › **Thioglycerol Promega\*:** A208B-C
- \* or equivalent
- › **ELITE InGenius PCR Cassette:** INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set:** INT032CS
- › **BCR-ABL P210 - ELITE Positive Control:** CTRG07PLD210
- › **BCR-ABL P210 ELITE Standard:** STDG07PLD210
- › **PHILADELPHIA P210 RNA Reference:** SPG07PLD210
- › **ELITE InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **300 µL Filter Tips Axygen:** TF-350-L-R-S
- › **2 mL Sarstedt tube :** 72.694.005

## F. ELITE InGenius protocol

- |                            |                        |                            |         |
|----------------------------|------------------------|----------------------------|---------|
| › Sample volume            | 200 µL                 | › Report unitage           | %P210   |
| › Total eluate volume      | 100 µL                 | › Frequency of controls    | 15 days |
| › PCR eluate input volume  | 10 µL for each PCR mix | › Frequency of calibration | 60 days |
| › BCR-ABL Q-PCR Mix volume | 20 µL for each PCR mix |                            |         |

## G. Sample pre-treatment

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

## H. Procedure

For the Calibration follow the table below:

Target	Number of Samples	PreMix	PCR MasterMix	RT EnzymeMix
P210	5	30 µL	90 µL	0.9 µL
ABL	3	20 µL	60 µL	0.6 µL

For Controls and samples follow the table below:

Number of Samples	P210 or ABL PreMix	PCR MasterMix	RT Enzyme Mix
1	15 µL	45 µL	0.5 µL
2	25 µL	75 µL	0.8 µL
3	40 µL	120 µL	1.2 µL

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

## I. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
(PBL) Peripheral Blood Leukocyte	<b>0.0025%</b>	<b>97%</b> 32/33*	<b>95.1%</b> 39/41*

*\*confirmed samples/ tested samples*

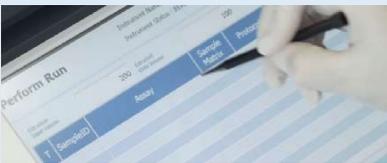
## J. Procedures

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

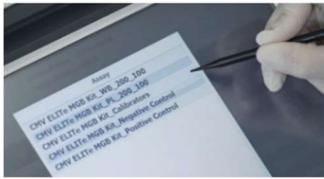
### Before analysis

<p><b>1.</b> Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed" or "Open"</p>	<p>Verify calibrators: BCR-ABL P210 Q-PCR Standard in the "Calibration menu". Verify controls: BCR-ABL P210 pos. and neg. controls in the "Control menu" NB: Both have been run, approved and not expired</p>	<p><b>2.</b> Thaw all the reagents and prepare 2 complete reaction mixture (P210 and ABL Mix) by adding into the dedicated 2 mL tube the calculated volumes of the three components for each Mix. Mix by vortexing at low speed for 10 seconds three times, centrifuge the tube for 5 seconds The complete reaction mixture should be used within 5 hours when kept on board in the refrigerated block</p>
--	---	--

### Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

4. Select the "Assay protocol BCR-ABL P210 ELITE\_PBL\_200\_100"



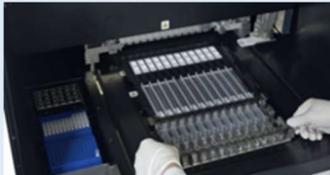
5. Select the sample position: sonication tube



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



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



8. Close the door Start the run



9. View, approve and store the results



### Procedure 2 - PCR only

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

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

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

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

8. Close the door Start the run

9. View, approve and store the results

### Procedure 3 - Extraction only

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

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

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

7. Close the door Start the run

8. Archive the eluate sample

# BCR-ABL P210 ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Code: RTSG07PLD210



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

## A. Intended use

The **BCR-ABL P210 ELITE MGB Kit** is a qualitative and quantitative, reverse transcription and amplification of nucleic acids assay for the detection of the mRNA of the BCR-ABL rearrangement, t(9;22) translocation, *Philadelphia* chromosome, variant P210 (P210) and for the quantification of the mRNA of P210 compared with the mRNA of the gene codifying the kinase protein Abelson (ABL). The assay is CE-IVD validated in combination with ABI PCR thermal cyclers (Thermo-Fisher) and and laboratory validated extraction system such as the «Maxwell® CSC» (Promega) automatic extraction system or other equivalent products.

## Amplified sequence

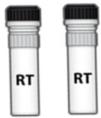
	Gene	Fluorophore
Target	BCR-ABL rearrangement (variant P210 b3a2 and variant P210 b2a2)	FAM
Internal Control	ABL (exons a2a3)	FAM

## B. Validated matrix

- › Peripheral blood collected in EDTA or sodium citrate or bone marrow\*

\*Lympho-monocyte and/or leukocyte suspensions must be extracted from matrices mentioned above

## C. Kit content

P210 PreMix	ABL PreMix	PCR Master Mix	RT Enzyme Mix*
			
1 tube of 270 µL 50 reactions 6 freeze-thaw cycles <b>WHITE CAP</b>	1 tube of 270 µL 50 reactions 6 freeze-thaw cycles <b>NEUTRAL CAP</b>	2 tubes of 820 µL 50 reactions 6 freeze-thaw cycles per tube <b>NEUTRAL CAP</b>	2 tubes of 20 µL 50 reactions 6 freeze-thaw cycles per tube <b>CAP with BLACK INSERT</b>

- › Maximum shelf-life: 18 months 25 reactions in duplicate

- › Storage Temperature: -20°C

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

## D. Material required not provided in the kit

- › Maxwell® CSC: AS6000
- › 7500 Fast Dx, 7300 and 7900 PCR Instrument
- › BCR-ABL P210 ELITE Standard: STDG07PLD210
- › BCR-ABL P210 - ELITE Positive Control: CTRG07PLD210
- › PHILADELPHIA P210 RNA Reference: SPG07PLD210
- › Molecular biology grade water

## E. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Maxwell - ABI	Peripheral blood or bone marrow	<b>0,0016% P210%</b> 10 <sup>-5.0</sup> Dilution	<b>100%</b> (49/49)	<b>100%</b> (31/31)

## F. Procedure

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

### Complete reaction mixtures reconstitution

1. Thaw P210 PreMix and ABL PreMix, PCR MasterMix, vortex 10 sec 3 times, spin down 5 sec
2. RT Enzyme Mix should not be exposed to T° > -20°C more than 10min. Gently shake, spin down 5 sec
3. Prepare two 1.5 ml tube, one for the complete reaction mixture of P210 and the other for complete reaction mixture ABL
4. Calculate the required volume of the 3 components for each complete reaction mixture

**Note:** The volumes indicated in the table are sufficient for the setup of the reactions for reverse transcription and real time amplification required for the number of samples to be tested, negative control and Q-PCR Standard, in duplicate plus an adequate safety excess.

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

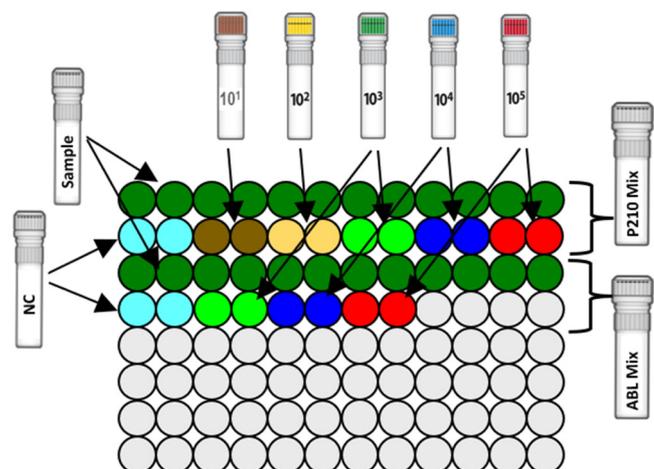
### Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300, 7900 PCR instruments

1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "P210" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "ABL" detector with "FAM" and quencher "none"
4. Set passive reference as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300, 7900 instruments
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 56°C

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

### Amplification - PCR Set-up

1. Thaw BCR-ABL P210 Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Prepare the "P210 PCR Mix" and "ABL PCR Mix" by adding the required volume of three components as reported in table above. The complete reaction mixture should be used within 30 min and cannot be stored
4. Pipet 20 µL of "P210 PCR-Mix after reconstitution in all microplate wells in use
5. Pipet 20 µL of "ABL PCR Mix" after reconstitution in all microplate wells in use
6. Add, 10 µL of extracted RNA in sample wells, 10 µL of molecular grade water in Negative Control well, and 10 µL of the 5 Q-PCR Standards in standard curve wells
7. Extracted RNA samples, Q-PCR Standards and Negative Control must be pipet in duplicate
8. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
9. Transfer the microplate in the thermocycler and start



### Amplification - Threshold for quantitative analysis

Instrument	P210 FAM	ABL FAM
7500 Fast Dx Real Time PCR	0.1	0.1
7300 and 7900 Real Time PCR	0.1	0.1

### Interpretation - quantitative results

Detector FAM	mRNA	Quantity of mRNA
Ct determined	Detected	Quantity
<b>Ct Undetermined</b>	<b>Not detected</b>	<b>0</b>

P210 Ct value Neg-Control	Results	Amplification/Detection
Ct Undetermined	Negative	Correct

ABL Ct value Neg-Control	Results	Amplification/Detection
Ct Undetermined	Negative	Correct

Sample	mRNA of P210	mRNA of ABL	Calculated Quantity of mRNA of P210	Calculated Quantity of mRNA of ABL
1 <sup>st</sup> replicate	DETECTED	Quantity ≥ 10,000	Sum Quantity	Sum Quantity
2 <sup>nd</sup> replicate	DETECTED	Quantity ≥ 10,000		
1 <sup>st</sup> replicate	NOT DETECTED	Quantity ≥ 10,000	0	Sum Quantity
2 <sup>nd</sup> replicate	NOT DETECTED	Quantity ≥ 10,000		
1 <sup>st</sup> replicate	Quantity < 10 copies	Quantity ≥ 10,000	Quantity	Sum Quantity
2 <sup>nd</sup> replicate	NOT DETECTED	Quantity ≥ 10,000		
1 <sup>st</sup> replicate	Quantity > 10 copies	Quantity ≥ 10,000	Retest the sample	
2 <sup>nd</sup> replicate	NOT DETECTED	Quantity ≥ 10,000		
1 <sup>st</sup> replicate	DETECTED or NOT DETECTED	Quantity < 10,000	Retest the sample	
2 <sup>nd</sup> replicate	DETECTED or NOT DETECTED	Quantity ≥ 10,000		
1 <sup>st</sup> replicate	DETECTED or NOT DETECTED	Quantity < 10,000	Retest the sample	
2 <sup>nd</sup> replicate	DETECTED or NOT DETECTED	Quantity < 10,000		

### Percentage of copies of P210 mRNA normalized to ABL mRNA copies (P210 %)

Detector FAM	mRNA	P210 %
P210 Ct determined	Detected	$\frac{\text{Calculated Quantity of mRNA of P210}}{\text{Calculated Quantity of mRNA of ABL}} \times 100$
ABL Ct determined	Detected (Quantity ≥ 10,000)	