

BCL2 oligomix Alert kit
reagente per l'amplificazione "nested" del DNA

REF BANG08-02

PRINCIPIO DEL SAGGIO

La procedura prevede l'esecuzione di tre tipi di reazioni di amplificazione, MBR, mcr e ABL, con un termostato programmabile (thermal - cycler).

La reazione MBR prevede due successive reazioni di amplificazione (nested) specifiche per il riarrangiamento BCL2-IgH, variante MBR (MBR).

La reazione mcr prevede due successive reazioni di amplificazione (nested) specifiche per il riarrangiamento BCL2-IgH, variante mcr (mcr).

La reazione ABL prevede una sola reazione di amplificazione (single round) specifica per il gene ABL (ABL) che è utilizzata come controllo di idoneità del campione.

Nel caso delle reazioni MBR e mcr una prima reazione di amplificazione specifica per una regione del riarrangiamento BCL2-IgH è condotta nella prima provetta partendo dal DNA estratto dai campioni in esame. Quindi una seconda reazione di amplificazione specifica per il riarrangiamento è condotta nella seconda provetta partendo dal prodotto della prima reazione di amplificazione.

La presenza dei prodotti specifici della seconda reazione di amplificazione indica la presenza del DNA del riarrangiamento BCL2-IgH nel campione di partenza.

Nel caso della reazione ABL, la reazione di amplificazione specifica per una regione del gene ABL è condotta nella provetta partendo dal prodotto della prima reazione di amplificazione.

La presenza del prodotto specifico dell'amplificazione di controllo indica la presenza del DNA del gene ABL nel campione di partenza.

DESCRIZIONE DEL KIT

Il kit fornisce i seguenti componenti:

MBR OligoMIX e mcr OligoMIX di prima amplificazione

Miscela ottimizzata di reagenti per l'amplificazione degli acidi nucleici in una soluzione di stabilizzazione, **prealiquotate in provette «monotest» pronte all'uso**. Ogni provetta contiene 40 µL di soluzione e 50 µL di olio di vaselina.

MBR OligoMIX è aliquotata in **provette «monotest» BLU**.

mcr OligoMIX è aliquotata in **provette «monotest» NEUTRE**.

Le miscele di reagenti forniscono gli oligonucleotidi di innesco della prima amplificazione, il sistema tampone, il cloruro di magnesio e i nucleotidi trifosfati.

Nel caso di **MBR OligoMIX**, gli oligonucleotidi di innesco sono specifici per le regioni genomiche **MBR e IgH**.

Nel caso di **mcr OligoMIX**, gli oligonucleotidi di innesco sono specifici per le regioni genomiche **mcr e IgH**.

MBR OligoMIX e mcr OligoMIX di seconda amplificazione

Miscela ottimizzata di reagenti per l'amplificazione degli acidi nucleici in una soluzione di stabilizzazione, **prealiquotata in provette «monotest» pronte all'uso**. Ogni provetta contiene 44 µL di soluzione e 50 µL di olio di vaselina.

MBR OligoMIX è aliquotata in **provette «monotest» ROSSE**.

mcr OligoMIX è aliquotata in **provette «monotest» VERDI**.

Le miscele di reagenti forniscono gli oligonucleotidi di innesco della seconda amplificazione, il sistema tampone, il cloruro di magnesio e i nucleotidi trifosfati.

Nel caso di **MBR OligoMIX**, gli oligonucleotidi di innesco sono specifici per le regioni genomiche **MBR e IgH**.

Nel caso di **mcr OligoMIX**, gli oligonucleotidi di innesco sono specifici per le regioni genomiche **mcr e IgH**.

BCL2 oligomix Alert kit

reagente per l'amplificazione "nested" del DNA

REF BANG08-02



SOMMARIO

USO PREVISTO	pag. 1
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL KIT	pag. 2
MATERIALE INCLUSO NEL KIT	pag. 3
MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL KIT	pag. 4
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	pag. 4
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 4
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 6
PROCEDURA	pag. 7
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 13
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 14
BIBLIOGRAFIA	pag. 15
PROBLEMI E SOLUZIONI	pag. 16
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 18

USO PREVISTO

Il prodotto «BCL2 oligomix Alert kit» è un saggio qualitativo di amplificazione degli acidi nucleici per la ricerca del DNA del riarrangiamento BCL2-IgH, traslocazione t(14;18), varianti MBR e mcr nel DNA estratto da campioni di sangue periferico raccolto in EDTA, sangue midollare raccolto in EDTA o sodio citrato, e campioni biotipici freschi e congelati.

Il prodotto trova impiego, insieme ai dati clinici e ad altri esami di laboratorio, nella diagnosi e nel monitoraggio della malattia minima residua in pazienti affetti da linfoma follicolare o linfoma a grandi cellule.

BCL2 oligomix Alert kit
reagente per l'amplificazione "nested" del DNA

REF BANG08-02

ABL OligoMIX per l'amplificazione di controllo

Una miscela ottimizzata di reagenti per l'amplificazione degli acidi nucleici in una soluzione di stabilizzazione, **prealiquotata in provette «monotest» GIALLE pronte all'uso**. Ogni provetta contiene 40 µL di soluzione e 50 µL di olio di vaselina.

La miscela di reagenti fornisce gli oligonucleotidi di innesco dell'amplificazione di controllo, il sistema tampone, il cloruro di magnesio e i nucleotidi trifosfati.

Gli oligonucleotidi di innesco sono specifici per il gene **ABL**.

Il kit consente di effettuare **25 reazioni**, controlli positivi e negativi compresi.

MATERIALE INCLUSO NEL KIT

Componente	Descrizione	Quantità	Composizione	Etichettatura
MBR OligoMIX di prima amplificazione	miscela di amplificazione in provette BLU da 0,2 mL	25 x 90 µL	Oligonucleotidi esterni, Cloruro di potassio, TRIS base, TRIS cloridrato, Triton X-100, Cloruro di magnesio, Desossinucleotidi trifosfati, olio di vaselina	-
mcr OligoMIX di prima amplificazione	miscela di amplificazione in provette NEUTRE da 0,2 mL	25 x 90 µL	Oligonucleotidi esterni, Cloruro di potassio, TRIS base, TRIS cloridrato, Triton X-100, Cloruro di magnesio, Desossinucleotidi trifosfati, olio di vaselina	-
ABL OligoMIX amplificazione di controllo	miscela di amplificazione in provette GIALLE da 0,2 mL	25 x 90 µL	Oligonucleotidi, Cloruro di potassio, TRIS base, TRIS cloridrato, Triton X-100, Cloruro di magnesio, Desossinucleotidi trifosfati, olio di vaselina	-
MBR OligoMIX di seconda amplificazione	miscela di amplificazione in provette ROSSE da 0,2 mL	25 x 94 µL	Oligonucleotidi interni, Cloruro di potassio, TRIS base, TRIS cloridrato, Triton X-100, Cloruro di magnesio, Desossinucleotidi trifosfati, olio di vaselina	-
mcr OligoMIX di seconda amplificazione	miscela di amplificazione in provette VERDI da 0,2 mL	25 x 94 µL	Oligonucleotidi interni, Cloruro di potassio, TRIS base, TRIS cloridrato, Triton X-100, Cloruro di magnesio, Desossinucleotidi trifosfati, olio di vaselina	-

BCL2 oligomix Alert kit
reagente per l'amplificazione "nested" del DNA

REF BANG08-02

MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL KIT

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in lattice o simili.
- Microcentrifuga da banco (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a dispensazione positiva (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL).
- Acqua bidistillata sterile.
- Termostato programmabile (thermal - cycler).

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del DNA dai campioni da analizzare, per il controllo positivo di amplificazione e per la rivelazione del DNA amplificato **non** sono inclusi in questo kit. Per eseguire queste fasi analitiche si consiglia l'impiego dei seguenti prodotti di ELITechGroup S.p.A.:

«**EXTRAcell**» (codice EXTD02), kit di estrazione del DNA da campioni cellulari; il kit consente di effettuare 50 estrazioni.

«**EXTRAffin**» (codice EXTF01), kit di estrazione di acidi nucleici da campioni biotici; il kit consente di effettuare 50 estrazioni.

«**BCL2 - Positive Control**» (codice CTRG08), controllo positivo di amplificazione di DNA plasmidico; il prodotto fornisce controllo per 25 sessioni.

«**DNA polymerase 2U / µL**» (codice ER40 ed ER140), enzima DNA polimerasi termostabile per l'amplificazione degli acidi nucleici; i prodotti consentono di effettuare 125 reazioni.

«**ELECTROPHORESIS 3**» (codice EPH03), rivelazione del DNA amplificato per elettroforesi su gel di agaroso; il kit consente di effettuare 120 rivelazioni.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

Avvertenze e precauzioni generali

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

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

Indossare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi o la faccia.
Non pipettare a bocca alcuna soluzione.
Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree di lavoro.
Lavarsi bene le mani dopo avere maneggiato i campioni e i reagenti.
Eliminare i reagenti avanzati ed i rifiuti secondo le norme vigenti.
Leggere tutte le istruzioni fornite nel kit prima di eseguire il saggio.
Attenersi alle istruzioni fornite nel kit durante l'esecuzione del saggio.
Rispettare la data di scadenza del kit.
Utilizzare solo i reagenti presenti nel kit e quelli consigliati dal produttore.
Non scambiare reagenti provenienti da lotti diversi.
Non utilizzare reagenti provenienti da kit di altri produttori.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

E' necessario disporre di aree separate per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rivelazione dei prodotti di amplificazione. Mai introdurre un prodotto di amplificazione nell'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.

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

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

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

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

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

Le provette contenenti le **OligoMIX** per la **prima amplificazione**, per la **seconda amplificazione** e per l'**amplificazione di controllo** sono monouso e pertanto devono essere utilizzate una volta sola in reazioni di amplificazione.

Le **OligoMIX** per la **prima amplificazione**, per la **seconda amplificazione** e per l'**amplificazione di controllo** presentano i seguenti consigli di prudenza (S):

S 23-25. Non respirare i gas/fumi/vapori/aerosol. Evitare il contatto con gli occhi.

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con **DNA** estratto dai seguenti campioni biologici: sangue periferico raccolto in EDTA, sangue midollare raccolto in EDTA o sodio citrato e campioni biotici freschi e congelati.

Sangue periferico raccolto in EDTA e sangue midollare raccolto in EDTA o sodio citrato

Il sangue periferico raccolto in EDTA o sangue midollare raccolto in EDTA o sodio citrato destinato all'estrazione del DNA deve essere prelevato secondo le indicazioni del laboratorio, trasportato a +2° / +8°C e conservato a +2° / +8°C per un massimo di tre giorni.

Non congelare il sangue periferico o midollare in modo da evitare la perdita di DNA.

Le istruzioni per l'estrazione del DNA sono contenute nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit «**EXTRAcell**».

Campioni biotici freschi e congelati

I campioni biotici freschi destinati all'estrazione del DNA devono essere prelevati secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2° / +8 °C e conservati a +2° / +8°C per un massimo di quattro ore oppure conservato congelato a -20°C per un massimo di trenta giorni oppure a -70°C per tempi più lunghi.

Si consiglia di suddividere in frammenti di circa 1 mm³ i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti.

Le istruzioni per l'estrazione del DNA sono contenute nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit «**EXTRAffin**».

Sostanze interferenti

Il DNA estratto dal campione di partenza non deve contenere eparina o emoglobina per evitare fenomeni di inibizione e la comparsa di frequenti risultati non validi.

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

Controlli di amplificazione

E' assolutamente necessario convalidare ciascuna sessione di amplificazione allestendo una reazione di controllo negativo e una reazione di controllo positivo.

Per il controllo negativo utilizzare acqua bidistillata sterile (non fornita nel kit) da aggiungere alla reazione al posto del DNA ottenuto dal campione.

Per il controllo positivo utilizzare il prodotto «**BCL2 - Positive Control**».

Controlli di qualità

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

PROCEDURA

Impostazione del ciclo termico

(Da eseguire nell'area di amplificazione / rivelazione dei prodotti di amplificazione)

Prima di iniziare la sessione è necessario:

- verificare che il blocco termico del termostato programmabile (thermal - cycler) sia compatibile con il formato delle **provette «monotest»** fornite nel kit (provette da 0,2 mL);
- riferendosi alla documentazione dello strumento, verificare la modalità di controllo della temperatura che il thermal - cycler adotta per l'esecuzione del ciclo termico;
- quando possibile, selezionare la modalità di **controllo della temperatura direttamente sul blocco termico** (per esempio thermal - cycler Hybaid™ o Eppendorf™);
- quando non è possibile (per esempio thermal - cycler GeneAmp® PCR System dell'Applied Biosystems™) utilizzare la modalità di controllo della temperatura predefinita;
- quando richiesto, impostare sul thermal - cycler il volume di reazione di **100 µL**;
- impostare sul thermal - cycler i parametri del ciclo termico descritti nelle tabelle seguenti.

Ciclo termico della prima amplificazione		
Numero di cicli	Temperature	Tempi
1 ciclo	95° C	4 min.
	95° C	1 min.
35 cicli	60° C	1 min.
	72° C	1 min.
1 ciclo	72° C	5 min.

Ciclo termico della seconda amplificazione		
Numero di cicli	Temperature	Tempi
1 ciclo	95° C	2 min.
	95° C	1 min.
30 cicli	60° C	1 min.
	72° C	1 min.
1 ciclo	72° C	5 min.

Allestimento della prima amplificazione

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

Ogni campione richiede l'uso di un tubo. Il kit consente di effettuare 25 reazioni MBR, 25 reazioni mcr, 25 reazioni ABL, controlli positivi e negativi compresi. Il numero minimo di reazioni per una sessione è nove: tre reazioni MBR (controllo positivo, controllo negativo e campione in analisi), tre reazioni mcr (idem come prima), tre reazioni ABL (idem come prima).

Prima di iniziare la sessione è necessario:

- scongelare i campioni da analizzare, il «**BCL2 - Positive Control**», centrifugarli per 5 secondi per riportare sul fondo il contenuto e tenerli in ghiaccio;
- scongelare una **provetta «monotest» BLU (MBR)** per ciascuno dei campioni da analizzare, una per il controllo negativo ed una per il controllo positivo, centrifugarle* per 5 secondi per riportare sul fondo il contenuto, marcarle in modo riconoscibile con un pennarello indelebile e tenerle in ghiaccio.
- scongelare una **provetta «monotest» NEUTRA (mcr)** per ciascuno dei campioni da analizzare, una per il controllo negativo ed una per il controllo positivo, centrifugarle* per 5 secondi per riportare sul fondo il contenuto, marcarle in modo riconoscibile con un pennarello indelebile e tenerle in ghiaccio.
- scongelare una **provetta «monotest» GIALLA (ABL)** per ciascuno dei campioni da analizzare e una per il controllo negativo, centrifugarle* per 5 secondi per riportare sul fondo il contenuto, marcarle in modo riconoscibile con un pennarello indelebile e tenerle in ghiaccio.

***Nota bene:** Le **provette «monotest»** sono del tipo "a parete sottile" e devono essere manipolate con attenzione per evitarne la rottura. Le centrifugazioni devono essere eseguite con gli appositi riduttori quando necessario e secondo le modalità stabilite da questo manuale di istruzioni per l'uso.

- prelevare l'enzima «**DNA pol. 2U / µL**», centrifugarlo per 5 secondi per riportare sul fondo il contenuto e tenerlo in ghiaccio;
- diluire come descritto nella tabella seguente l'enzima «**DNA pol. 2U / µL**» con acqua bidistillata sterile. Preparare un volume di enzima diluito sufficiente per tutte le reazioni **MBR, mcr, ABL** (controlli compresi) più una, per avere un margine di sicurezza. L'enzima diluito **non** può essere conservato.

Numero di reazioni	DNA pol. 2U / µL	Acqua	Volume totale
4	2,0 µL	18,0 µL	20 µL
5	2,5 µL	22,5 µL	25 µL
6	3,0 µL	27,0 µL	30 µL
7	3,5 µL	31,5 µL	35 µL
8	4,0 µL	36,0 µL	40 µL
9	4,5 µL	40,5 µL	45 µL
10	5,0 µL	45,0 µL	50 µL
11	5,5 µL	49,5 µL	55 µL
12	6,0 µL	54,0 µL	60 µL
13	6,5 µL	58,5 µL	65 µL
14	7,0 µL	63,0 µL	70 µL
15	7,5 µL	67,5 µL	75 µL
16	8,0 µL	72,0 µL	80 µL
17	8,5 µL	76,5 µL	85 µL
18	9,0 µL	81,0 µL	90 µL
19	9,5 µL	85,5 µL	95 µL
20	10,0 µL	90,0 µL	100 µL
21	10,5 µL	94,5 µL	105 µL

1. Aggiungere a ciascuna **provetta «monotest» BLU (MBR), NEUTRA (mcr) e GIALLA (ABL) 5 µL** di DNA polimerasi termostabile diluita (1 U).
2. Aggiungere a ciascuna **provetta «monotest» BLU, NEUTRA e GIALLA 5 µL** di DNA ottenuto. Procedere nello stesso modo con il controllo negativo e con il controllo positivo.
3. Trasferire le **provette «monotest» BLU, NEUTRE e GIALLA** nel thermal - cycler nell'area di amplificazione / rivelazione dei prodotti di amplificazione e avviare il ciclo termico della prima amplificazione.

Allestimento della seconda amplificazione

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

Prima di iniziare la sessione è necessario:

- prelevare l'enzima «**DNA pol. 2U / µL**», centrifugarlo per 5 secondi per riportare sul fondo il contenuto e tenerlo in ghiaccio;
- scongelare tante **provette «monotest» ROSSE (MBR)** quante sono quelle blu, centrifugarle* per 5 secondi per riportare sul fondo il contenuto, marcarle in modo riconoscibile con un pennarello indelebile e tenerle in ghiaccio.
- scongelare tante **provette «monotest» VERDI (mcr)** quante sono quelle neutre, centrifugarle* per 5 secondi per riportare sul fondo il contenuto, marcarle in modo riconoscibile con un pennarello indelebile e tenerle in ghiaccio.

***Nota bene:** Le **provette «monotest»** sono del tipo "a parete sottile" e devono essere manipolate con attenzione per evitarne la rottura. Le centrifugazioni devono essere eseguite con gli appositi riduttori quando necessario e secondo le modalità stabilite da questo manuale di istruzioni per l'uso.

- diluire come descritto nella tabella precedente l'enzima «DNA pol. 2U / µL» con acqua bidistillata sterile. Preparare un volume di enzima diluito sufficiente per tutte le reazioni MBR e mcr previste (controlli compresi) più una, per avere un margine di sicurezza. L'enzima diluito non può essere conservato.

4. Aggiungere a ciascuna provetta «monotest» ROSSA (MBR) e VERDE (mcr) 5 µL di DNA polimerasi termostabile diluita (1 U).
5. Aggiungere a ciascuna provetta «monotest» ROSSA (MBR) 1 µL di prodotto della prima amplificazione dalla corrispondente provetta «monotest» BLU (MBR).
6. Aggiungere a ciascuna provetta «monotest» VERDE (mcr) 1 µL di prodotto della prima amplificazione dalla corrispondente provetta «monotest» NEUTRA (mcr).

Nota bene: Il prodotto della prima amplificazione è in grado di contaminare i saggi successivi. Confinare il prodotto della prima amplificazione residuo e cambiare i guanti alla fine di questa fase della procedura.

7. Trasferire le provette «monotest» ROSSE e VERDI nel thermal - cycler nell'area di amplificazione / rivelazione dei prodotti di amplificazione e avviare il ciclo termico della seconda amplificazione.

Nota bene: Il prodotto di reazione può essere conservato a -20°C per un massimo di un mese.

Rivelazione del prodotto specifico di amplificazione

(Da eseguire nell'area di amplificazione / rivelazione dei prodotti di amplificazione)

Il prodotto specifico della seconda amplificazione può essere rivelato ed identificato mediante separazione elettroforetica utilizzando un gel d'agaroso al 4% con bromuro di etidio 1 µg / mL in tampone TAE 1x (20 mM TRIS base, 20 mM TRIS acetato, 1 mM EDTA disodico), come nel prodotto «ELECTROPHORESIS 3».

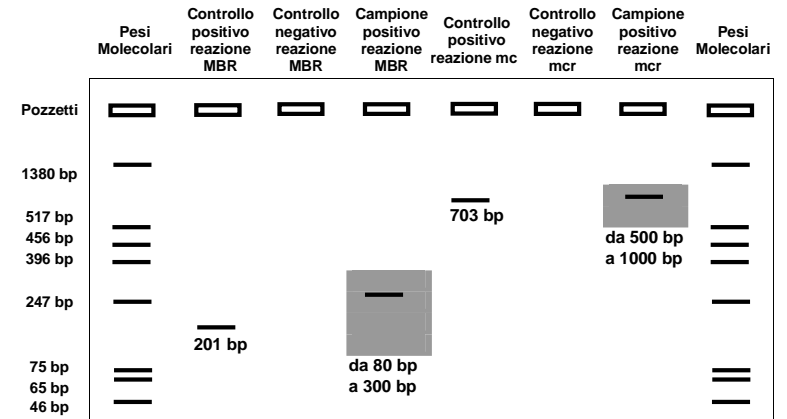
I prodotti specifici della seconda amplificazione MBR hanno dimensioni: **da 80 a 300 bp**

I prodotti specifici della seconda amplificazione mcr hanno dimensioni di: **da 500 a 1000 bp**

Il prodotto specifico dell'amplificazione ABL ha dimensioni di: **715 bp**

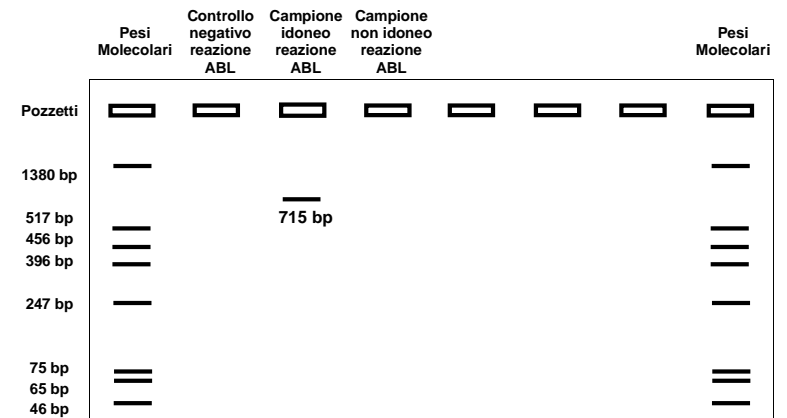
Nota bene: Il prodotto della seconda amplificazione è in grado di contaminare i saggi successivi. Confinare il prodotto della seconda amplificazione residuo e gli scarti prodotti nella fase di rivelazione.

A titolo di esempio, è riportata di seguito una figura schematica che rappresenta il risultato della separazione elettroforetica dei prodotti della seconda amplificazione MBR e mcr.



Nota bene: A causa di un'omologia talvolta presente nella regione J del gene IgH è possibile osservare, in associazione al prodotto specifico della seconda amplificazione MBR o mcr, un ulteriore prodotto di amplificazione dalle dimensioni superiori di circa 500 bp.

A titolo di esempio, è riportata di seguito una figura schematica che rappresenta il risultato della separazione elettroforetica dei prodotti della amplificazione ABL.



E' assolutamente necessario convalidare l'identità del prodotto della seconda amplificazione di un campione confrontando la sua migrazione su gel con la migrazione di un marker di peso molecolare e con la migrazione del prodotto della seconda amplificazione del controllo positivo.

L'eventuale presenza di prodotti aspecifici di dimensioni diverse da quelle dei prodotti specifici della seconda amplificazione di un campione non ha alcun significato per quanto riguarda la ricerca del DNA dei riarrangiamenti MBR e mcr e del DNA del gene ABL.

Interpretazione dei risultati

I risultati delle reazioni di controllo negativo e di controllo positivo sono utilizzati per convalidare la sessione di amplificazione come descritto nelle tabelle seguenti:

Amplificazione dei controlli negativi	Amplificazione
Prodotto specifico MBR, mcr e ABL	
ASSENTE	CORRETTA
Amplificazione dei controlli positivi	Amplificazione
Prodotto specifico MBR e mcr	
PRESENTE	CORRETTA

Se il prodotto specifico di amplificazione è presente in una delle reazioni di controllo negativo, si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (contaminazione) che possono causare risultati falsi positivi. La sessione non è valida e deve essere ripetuta a partire dalla fase di amplificazione.

Se il prodotto specifico di amplificazione è assente in una delle reazioni di controllo positivo, si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (amplificazione non efficiente o assente) che possono causare risultati falsi negativi. La sessione non è valida e deve essere ripetuta a partire dalla fase di amplificazione.

Questo kit è in grado di rivelare una quantità minima di 10 copie di DNA dei riarrangiamenti MBR o mcr per reazione di amplificazione (vedi paragrafo Caratteristiche delle prestazioni a pag. 14).

I risultati delle reazioni relative ai campioni in analisi sono utilizzati per valutare la presenza del DNA di MBR e mcr come descritto nella tabella seguente:

Amplificazione del campione		Idoneità del campione	Risultato del saggio	DNA di MBR o mcr
Prodotto specifico MBR o mcr	Prodotto specifico ABL			
ASSENTE	ASSENTE	non idoneo	non valido	-
	PRESENTE	idoneo	valido, negativo	NON RIVELATO
PRESENTE	ASSENTE	idoneo*	valido, positivo	PRESENTE
	PRESENTE	idoneo	valido, positivo	PRESENTE

Se nelle reazioni di un campione, sono assenti sia il prodotto specifico di amplificazione di MBR e mcr sia quello del gene ABL dell'amplificazione di controllo, si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (amplificazione non efficiente o assente) o nella fase di estrazione (perdita del DNA, presenza di inibitori, DNA del campione degradato o campione di partenza con un numero di cellule insufficiente) che possono causare risultati falsi negativi. Il campione non è idoneo, il saggio non è valido e deve essere ripetuto a partire dall'estrazione di un nuovo campione.

Se nella reazione di un campione è assente il prodotto specifico di amplificazione di MBR e mcr ed è presente quello del gene ABL dell'amplificazione di controllo, il DNA dei riarrangiamenti MBR e mcr non è stato rivelato nel DNA estratto dal campione ma non si può escludere che il DNA dei riarrangiamenti MBR e mcr sia presente ad un titolo inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedi paragrafo Caratteristiche delle prestazioni a pagina 14). In questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

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

***Nota bene:** Quando in una reazione di amplificazione è presente il prodotto specifico di amplificazione dei riarrangiamenti MBR o mcr e quello del gene ABL dell'amplificazione di controllo è assente, il campione è comunque idoneo e il risultato positivo del saggio è valido. Infatti la reazione di amplificazione del gene ABL ha una efficienza minore (single round) della reazione di amplificazione di MBR e mcr (nested).

Calcolo dei limiti di rivelazione

Il limite di rivelazione, quando si utilizza una particolare metodica di estrazione e riferito ad una particolare unità di misura, può essere calcolato a partire dal limite di rivelazione della reazione di amplificazione secondo questa formula:

$$\text{Limite di rivelazione} = Fe \times Ee \times Fa \times 10 \text{ copie DNA / reazione}$$

Fe è il rapporto tra l'unità di misura di riferimento e il campione usato nell'estrazione, per esempio:

Kit di estrazione	unità di misura	campione in estrazione	Fe
«EXTRAcell»	copie DNA / 1.000.000 cellule	500.000 cellule	$Fe = 10^6 \text{ c.} / 5 \times 10^5 \text{ c.} = 2$

Ee è l'inverso dell'efficienza dell'estrazione, per esempio:

Kit di estrazione	efficienza dell'estrazione	Ee
«EXTRAcell»	efficienza circa 100%, cioè 1,0	$Ee = 1 / 1,0 = 1$

Fa è il rapporto tra il volume del DNA estratto e il volume usato nella reazione di amplificazione, per esempio:

Kit di estrazione	volume dell'estratto	volume in reazione	Fa
«EXTRAcell»	100 µL	5 µL	$Fa = 100 \mu\text{L} / 5 \mu\text{L} = 20$

Quando si utilizzano i kit di estrazione di ELITechGroup S.p.A. il limite è:

Kit di estrazione	Limiti di rivelazione
«EXTRAcell»	Limite di rivelazione = 400 copie DNA / 1.000.000 cellule

LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare con questo prodotto soltanto il DNA estratto dai seguenti campioni biologici: sangue periferico raccolto in EDTA, sangue midollare raccolto in EDTA o sodio citrato, campioni biotici freschi e congelati.

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

Non utilizzare con questo prodotto DNA estratto contaminato da emoglobina: queste sostanze possono inibire le reazioni di amplificazione degli acidi nucleici e possono causare risultati non validi.

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

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

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

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

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

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

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

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

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che il DNA dei riarrangiamenti MBR e mcr non è stato rivelato nel DNA estratto dal campione ma non si può escludere che il DNA dei riarrangiamenti MBR e mcr sia presente ad un titolo inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedi paragrafo Caratteristiche delle prestazioni a pagina 14); in questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

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

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

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica: limite di rivelazione delle MBR OligoMIX e mcr OligoMIX

La sensibilità analitica di queste OligoMIX permette di identificare la presenza di circa 10 molecole di DNA bersaglio nei 5 µL di DNA estratto aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio, come limite di rivelazione, è stata determinata utilizzando come materiale di riferimento due DNA plasmidici, contenenti il prodotto di amplificazione, la cui concentrazione iniziale è stata misurata spettrofotometricamente (pMBR e pmcr).

Il DNA plasmidico pMBR è stato diluito ad un titolo di 10 copie / 5 µL e la diluizione è stata impiegata in due replicati in sei diverse sessioni per eseguire la procedura di amplificazione nested con la MBR OligoMIX, prodotto da ELITechGroup S.p.A.

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N sessioni	N replicati	Positivi MBR	Negativi MBR
10 copie pMBR	6	2	12	0

Il DNA plasmidico pmcr è stato diluito ad un titolo di 10 copie / 5 µL ed impiegato in due replicati in sei diverse sessioni per eseguire la procedura di amplificazione nested con la mcr OligoMIX, prodotto da ELITechGroup S.p.A.

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N sessioni	N replicati	Positivi mcr	Negativi mcr
10 copie pmcr	6	2	12	0

Sensibilità analitica: limite di rivelazione di ABL OligoMIX

La sensibilità analitica di questa OligoMIX permette di identificare la presenza di circa 100 molecole di DNA bersaglio nei 5 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del controllo di idoneità del campione, come limite di rivelazione, è stata determinata utilizzando come materiale di riferimento DNA genomico umano, la cui concentrazione iniziale è stata misurata spettrofotometricamente.

Il DNA genomico umano è stato diluito ad un titolo di 5 ng / 5 µL e la diluizione è stata impiegata in due replicati in sei diverse sessioni per eseguire la procedura di amplificazione single round con l'ABL OligoMIX, prodotto da ELITechGroup S.p.A.

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N sessioni	N replicati	Positivi ABL	Negativi ABL
5 ng DNA genomico umano	6	2	12	0

Sensibilità diagnostica: efficienza di rivelazione su eventuali polimorfismi

La sensibilità diagnostica del saggio, come efficienza di rivelazione su eventuali polimorfismi, è stata valutata per confronto di sequenze con banche dati nucleotidiche.

L'esame dell'allineamento delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco per il riarrangiamento MBR delle **MBR OligoMIX** con le sequenze disponibili in banca dati delle regioni genomiche del riarrangiamento BCL2-IgH ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative.

L'esame dell'allineamento delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco per il riarrangiamento mcr delle **mcr OligoMIX** con le sequenze disponibili in banca dati delle regioni genomiche del riarrangiamento BCL2-IgH ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative.

L'esame dell'allineamento delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco per il gene ABL delle **ABL OligoMIX** con le sequenze disponibili in banca dati della regione del gene ABL ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni.

Specificità diagnostica: campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata verificata eseguendo l'analisi di campioni di DNA genomico umano normale.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento del DNA genomico umano negativo per il riarrangiamento MBR e mcr, la cui concentrazione iniziale è stata misurata spettrofotometricamente.

Il DNA genomico umano è stato diluito alla concentrazione di 500 ng / 5 µL e la diluizione è stata impiegata in due replicati in sei diverse sessioni per eseguire la procedura di amplificazione nested con la MBR OligoMIX, prodotto da ELITechGroup S.p.A.

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N sessioni	N replicati	Positivi MBR	Negativi MBR
500 ng DNA genomico	6	2	0	12

Il DNA genomico umano è stato diluito alla concentrazione di 500 ng / 5 µL e la diluizione è stata impiegata in due replicati in sei diverse sessioni per eseguire la procedura di amplificazione nested con la mcr OligoMIX, prodotto da ELITechGroup S.p.A.

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N sessioni	N replicati	Positivi mcr	Negativi mcr
500 ng DNA genomico	6	2	0	12

Specificità analitica: marcatori potenzialmente interferenti

La specificità analitica del saggio, come crossreattività con altri marcatori potenzialmente interferenti, è stata valutata per confronto di sequenze con banche dati nucleotidiche.

L'esame dell'allineamento delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco per il riarrangiamento MBR delle **MBR OligoMIX** con le sequenze disponibili in banca dati di regioni genomiche umane diverse dalle regioni genomiche MBR e IgH, tra cui quelle del genoma umano completo, ha dimostrato la specificità del sistema di amplificazione.

L'esame dell'allineamento delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco per il riarrangiamento mcr delle **mcr OligoMIX** con le sequenze disponibili in banca dati di regioni genomiche umane dalle regioni genomiche mcr e IgH, tra cui quelle del genoma umano completo, ha dimostrato la specificità del sistema di amplificazione.

L'esame dell'allineamento delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco per il gene ABL delle **ABL OligoMIX** con le sequenze disponibili in banca dati di regioni genomiche umane diverse dal gene umano ABL, tra cui quelle del genoma umano completo, ha dimostrato la specificità del sistema di amplificazione.

Nota bene: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto sono registrati nella Sezione 7 del Fascicolo Tecnico di Prodotto "BCL2 oligomix Alert kit", FTP BANG08.

BIBLIOGRAFIA

J. G. Gribben et al. (1994) *Blood* 12: 3800 - 3807

PROBLEMI E SOLUZIONI

Prodotto specifico di amplificazione presente nella reazione di controllo negativo

Possibili cause	Soluzioni
Errore durante la dispensazione del DNA estratto.	Aprire una provetta per volta, evitare di spargere il contenuto della provetta, cambiare sempre puntale.
Errore durante la dispensazione del prodotto di prima amplificazione.	Aprire una provetta per volta, evitare di spargere il contenuto della provetta, cambiare sempre puntale.
Contaminazione dei reagenti preparati per la sessione.	Seguire con attenzione la diluizione e la dispensazione dell'enzima, cambiare sempre puntale.
Contaminazione dell'acqua sterile per la diluizione dell'enzima.	Utilizzare una nuova aliquota di acqua sterile.
Contaminazione dello stock di enzima.	Utilizzare una nuova aliquota di enzima.
Contaminazione dell'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.	Pulire superfici e strumenti con detergenti acquosi, lavare camici, sostituire provette e puntali in uso.

Prodotto specifico di amplificazione assente nella reazione del Positive Control

Possibili cause	Soluzioni
Enzima troppo diluito o errore durante la dispensazione dell'enzima.	Ricontrollare i calcoli di diluizione, seguire con attenzione la dispensazione dell'enzima e mescolare adeguatamente.
Errore durante la dispensazione del controllo positivo.	Seguire con attenzione la dispensazione del controllo positivo.
Degradazione del controllo positivo.	Utilizzare una nuova aliquota di controllo positivo.
Errore di impostazione del ciclo termico.	Controllare il ciclo termico impostato sul thermal - cycler.
Errore durante la dispensazione del prodotto di prima amplificazione.	Prelevare e dispensare con attenzione il prodotto di prima amplificazione nella seconda amplificazione.
Errore durante la dispensazione del prodotto di seconda amplificazione nel gel.	Caricare con attenzione il prodotto della seconda amplificazione nel gel.











Prodotti aspecifici di amplificazione presenti nelle reazioni dei campioni

Possibili cause	Soluzioni
Enzima troppo concentrato.	Ricontrollare i calcoli di diluizione dell'enzima.
Tempi di allestimento della prima reazione di amplificazione troppo lunghi.	Tenere in ghiaccio le provette a cui si è già aggiunto il DNA estratto fino al trasferimento sul thermal - cycler.
Errore di impostazione del ciclo termico.	Controllare il ciclo termico impostato sul thermal - cycler.
Eccesso di DNA estratto nella reazione.	Valutare la concentrazione del DNA estratto, non aggiungere più di 1 µg di DNA per reazione.

Prodotto specifico di amplificazione assente nella reazione ABL di controllo dei campioni

Possibili cause	Soluzioni
Presenza di eparina nel campione di sangue intero.	Il campione di sangue deve utilizzare EDTA o sodio citrato come anticoagulante.
Errore nella conservazione del campione di sangue.	Il sangue deve essere trattato per l'estrazione del DNA entro poche ore dal prelievo e non deve mai essere congelato.
Errore nella fase di estrazione.	Controllare le operazioni di estrazione. Allestire ed eseguire l'estrazione seguendo con attenzione le istruzioni.
Degradazione del campione estratto.	L'estrazione del DNA deve essere eseguita con materiale e reagenti esenti da DNasi. Il DNA estratto deve essere conservato a -20°C o a -70°C.
Errore nella fase di amplificazione.	Vedi i suggerimenti del paragrafo "Prodotto specifico di amplificazione assente nella reazione di controllo positivo".

LEGENDA DEI SIMBOLI

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

L'acquisto di questo prodotto permette all'acquirente di utilizzarlo per l'amplificazione di sequenze di acidi nucleici al fine di fornire servizi di diagnostica umana in vitro. Questo diritto è conferito solo se il prodotto fornito è utilizzato insieme ad un prodotto licenziato "Positive Control" ed uno per la rivelazione di ELITechGroup S.p.A. Nessun diritto generale o altra licenza di alcun tipo diversa da questo specifico diritto d'uso è conferito per mezzo dell'acquisto.