



All. A del Capitolato Speciale di Fornitura

FORNITURA DI UN SISTEMA ANALITICO COMPLETO PER L'ESECUZIONE DI TEST DIAGNOSTICI PER LA DETERMINAZIONE DI MALATTIE ONCOEMATOLOGICHE CON METODICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE.

CAPITOLATO TECNICO – SCHEDA FABBISOGNI

Il sistema analitico proposto dovrà rispondere, pena l'esclusione dalla gara, alle caratteristiche tecniche indispensabili ed obbligatorie di seguito indicate.

CARATTERISTICHE INDISPENSABILI ED OBBLIGATORIE

A) STRUMENTAZIONE

Le strumentazioni richieste dovranno essere:

- ◆ nuove, di ultima generazione, adeguate allo stato dell'arte, con aggiornamenti futuri gratuiti;
- ◆ corredate di tutti gli accessori necessari al buon funzionamento;
- ◆ conformi alle Norme CEI ed in possesso del Marchio CE;
- ◆ sufficienti ed idonee per la compiuta esecuzione dell'attività analitica richiesta;
- ◆ Le strumentazioni proposte, in base alle metodiche, dovranno essere come di seguito indicato:

a) STRUMENTAZIONE PER REALTIME

composta da:

- Termal Cycler per PCR Real Time marcato CE IVD;
- PC Computer il cui sistema operativo comprenda software per la gestione dello strumento, per la raccolta e per l'analisi dei dati;
- Strumento aperto all'inserimento di altre metodiche.

b) STRUMENTAZIONE PER PCR END POINT

composta da:

- Termociclatore CE programmabile con sistema di riscaldamento/raffreddamento di tipo MULTIPLETTIER.

Il termociclatore deve essere dotato di:

1. coperchio riscaldato per eliminare la necessità di usare olio minerale per prevenire l'evaporazione nei tubicini di reazione;

2. Software dotato di una funzione di calcolo della Temperatura di Melting dei Primers;
 3. AUTORESTART in caso di mancanza di energia elettrica, affinché lo strumento possa riprendere i cicli automaticamente al ripristino;
 4. uscita seriale per collegamento a stampante od a PC;
- Centrifuga da banco refrigerata per provette;
 - Celle per elettroforesi e relativi marcatori molecolari di riferimento;
 - Sistema di rivelazione con apparecchio fotografico digitale e stampante.

B) REAGENTI E MATERIALI DI CONSUMO

L'Azienda fornitrice deve essere in grado di offrire la totalità della gamma dei prodotti richiesti con marcatura CE-IVD.

I reagenti ed i materiali di consumo richiesti dovranno essere come di seguito indicato:

KIT DI ESTRAZIONE

- La Ditta deve poter fornire kit di estrazione di DNA a partire dal materiale biologico fresco, congelato e paraffinato e tutto il materiale necessario per l'estrazione di RNA integro e di ottima qualità a partire da materiale fresco e congelato.

KIT RETROTRASCRIZIONE

- La Ditta deve poter fornire materiale necessario, preferibilmente in formato monotest pronto all'uso utilizzando random primer che siano in grado di retrotrascrivere tutto l'RNA presente nell'estratto.

PCR End Point

Per tutti i dosaggi della diagnostica in PCR End Point che sono indicati ai punti successivi:

- Amplificazione genica mediante PCR-nested;
- Controlli positivi di amplificazione e gene di controllo interno inclusi nel kit;
- Rivelazione su gel già pronti all'uso;

Relativamente ai dosaggi richiesti:

- **Philadelphia:** la ditta deve poter fornire tutto il materiale necessario alla identificazione molecolare del riarrangiamento cromosomico BCR-ABL delle varianti p210 p190;
- **Inv 16:** la Ditta deve poter fornire tutto il materiale necessario alla identificazione molecolare del riarrangiamento cromosomico CBF beta-MYH11 A e ABL;
- **t(11;14):** La Ditta deve poter fornire tutto il materiale necessario alla identificazione molecolare del riarrangiamento cromosomico tra il gene Bcl1 sul cromosoma 11 e la regione J dei geni delle IgH sul cromosoma 14;
- **t(14;18):** La Ditta deve poter fornire tutto il materiale necessario alla identificazione molecolare del riarrangiamento cromosomico tra il gene Bcl2 sul cromosoma 18 e la regione J dei geni delle IgH sul cromosoma 14;

- **t(15;17):** La Ditta deve poter fornire tutto il materiale necessario alla identificazione molecolare del riarrangiamento cromosomico PML/RAR α (tutti e 3 i trascritti) ;
- **t(8;21):** La Ditta deve poter fornire tutto il materiale necessario alla identificazione molecolare del riarrangiamento cromosomico AML1/ETO;

Le 3 mutazioni (inv 16, AML1ETO, PMLRARA) possono in alternativa alla PCR nested essere eseguite con la strumentazione della Real Time qualitativa

CLONALITA' DEI LINFOMI B

- Amplificazione genica mediante primers dei riarrangiamenti VDJ;
- Controlli positivi di amplificazione e gene di controllo interno inclusi nel kit;
- Rivelazione su gel già pronti all'uso.

La Ditta deve poter fornire tutto il materiale necessario alla identificazione molecolare della presenza di una popolazione clonale di linfociti B mediante amplificazione del segmento VDJ del gene delle IgH.

CLONALITA' DEI LINFOMI T

- Amplificazione genica mediante primers dei riarrangiamenti VJ TCR-gamma;
- Controlli positivi di amplificazione e gene di controllo interno inclusi nel kit;
- Rivelazione su gel già pronti all'uso.

La Ditta deve poter fornire tutto il materiale necessario alla identificazione molecolare della presenza di una popolazione clonale di linfociti T mediante amplificazione del segmento VJ TCR-gamma.

DIAGNOSTICA IN REAL TIME PCR

Per tutti i dosaggi della diagnostica in Real Time PCR che sono indicati ai punti successivi:

- Sistemi completi di miscele di amplificazione contenenti l'enzima, i primers, le sonde wild-type e mutate, i controlli, curve standard a numero di copie noto per varianti e gene di controllo, materiale consumabile.
- Possibilità di condurre nella stessa seduta di analisi alle stesse condizioni termiche la ricerca delle due varianti (P210 e P190) di Bcr/Abl

Relativamente ai dosaggi richiesti:

- **BCR/ABL:** La Ditta deve poter fornire tutto il materiale necessario alla identificazione molecolare qualitativa e quantitativa del trascritto ibrido di fusione Bcr/Abl t(9;22), cromosoma Philadelphia variante P210 e P190, con un saggio di amplificazione e rivelazione con sonde fluorescenti; la Ditta deve inoltre fornire (per il BCRABL quantitativo) tutti i controlli per la calibrazione della reazione (controlli giornalieri) e i controlli standard secondari necessari per l'esecuzione di controlli di qualità interlaboratorio.
- **JAK2:** La Ditta deve poter fornire tutto il materiale necessario alla identificazione molecolare qualitativa della mutazione V617F sul gene Jak2 responsabile

dell'insorgenza di policitemia vera, con un saggio di amplificazione e rivelazione con sonde fluorescenti;

- **Wt1:** La Ditta deve poter fornire tutto il materiale necessario alla identificazione molecolare quantitativa del marcatore wt1 per il monitoraggio della malattia minima residua in caso di leucemie mieloidi e le sindromi mielodisplastiche;

FABBISOGNO ANNUO TIPOLOGIA E NUMERO DETERMINAZIONI

TEST	N. TEST/ANNO	SEDUTE ANALITICHE
Estrazione DNA da materiale fresco	300	5/7
Estrazione RNA	400	5/7
Estrazione DNA da materiale paraffinato	40	1/14
Retrotrascrizione	300	2/7
RealTime per Jak2 (qualitativo)	250	3/7
RealTime per Bcr/Abl variante P210 (quantitativo)	130	1/14
RealTime per Bcr/Abl variante P190 (quantitativo)	30	1/14
Real Time WT1 (quantitativo)	50	1/14
PCR nested o in Real Time per PML/RAR α (qualitativo)	10	Al bisogno
PCR nested o in Real Time per AML1/ETO (qualitativo)	10	Al bisogno
PCR-nested per Bcl1	20	1/21
PCR-nested per Bcl2	40	1/21
PCR-nested per Linfomi-B	30	1/21
PCR-nested per Linfomi-T	20	Al bisogno
PCR nested o in Real Time per inv 16 (qualitativo)	10	Al bisogno
PCR nested per philadelphia (P210, P190)	200	2/7

Il numero di determinazioni annue non è comprensivo dei controlli giornalieri/periodici e delle calibrazioni che devono essere previsti dalle Ditte concorrenti e conteggiati in maniera adeguata in sede di offerta. Il numero di controlli e delle calibrazioni dovrà essere calcolato considerando le sedute analitiche settimanali indicate. Il numero di determinazioni previste potrà variare al variare dell'assetto organizzativo del Laboratorio utilizzatore.