

CAPITOLATO TECNICO PER LA PROCEDURA DI ACQUISIZIONE DI REAGENTI DI GENETICA MOLECOLARE ONCOEMATOLOGICA

PRODOTTI RICHIESTI: REQUISITI MINIMI E QUANTITA' RICHIESTE

Tutti i reagenti analitici messi in gara nel lotto sono richiesti presupponendo acidi nucleici già estratti: pertanto tutti i kit dovranno essere eseguibili a partire da acidi nucleici ottenuti con il sistema di estrazione presente nel laboratorio.

1) Test bcr-abl p210 analisi quantitativa in real time (test richiesti/anno comprensivi di controlli positivi, negativi e standard = n. 900)

Si richiede fornitura di test completo per la quantificazione mediante real-time PCR dei trascritti p210 BCR-ABL b3a2 e b2a2 a partire da RNA estratto da campioni di midollo osseo o sangue periferico di pazienti affetti da leucemia mieloide cronica Philadelphia positiva. I reagenti (primers, probes e plasmidi per curva standard) devono essere conformi al protocollo EAC (Europe Against Cancer, Gabert et al, Leukemia, 2003). Il test deve essere validato su strumentazione ABI Prism TaqMan di proprietà e dotato di certificazione CE e IVD.

Si richiede che

- il test sia completo di miscele di amplificazione contenenti l'enzima, sonde e primers specifici pronti all'uso e materiale consumabile;
- la curva standard deve essere costituita da almeno 4 concentrazioni di standard pronti all'uso; deve essere presente un normalizzatore per la fluorescenza di fondo;
- standard unico contenente gene housekeeping e gene traslocato per garantire l'accuratezza del risultato normalizzato
- la curva standard sia allineata con il materiale certificato di riferimento ERM- AD 623 (fornire comprovata documentazione di validazione degli standard IRMM)
- fornitura di Philadelphia p210 RNA di Riferimento a 4 punti
- approvazione (sia del test sia dell RNA Reference) da parte di LabNet (Network di laboratori di biologia molecolare).

2) Test bcr-abl p190 analisi quantitativa in real time (test richiesti/anno comprensivi di controlli positivi, negativi e standard = n. 100)

Si richiede fornitura di test completo per la quantificazione mediante real-time dei trascritti p190 BCR-ABL a partire da RNA estratto da campioni di midollo osseo o sangue periferico di pazienti affetti da patologie Philadelphia positive. I reagenti (primers, probes e plasmidi per curva standard) devono essere conformi al protocollo EAC (Europe Against Cancer, Gabert et al, Leukemia, 2003). Il kit deve essere validato su strumentazione ABI Prism TaqMan di proprietà e dotato di certificazione CE e IVD.

Si richiede che

- sia completo di miscele di amplificazione contenenti l'enzima, sonde e primers specifici, curve - standard a numero noto e materiale consumabile
- la curva standard deve essere costituita da almeno 4 concentrazioni di standard pronti all'uso; deve essere presente un normalizzatore per la fluorescenza di fondo;
- standard unico contenente gene housekeeping e gene traslocato per garantire l'accuratezza del risultato normalizzato

3) Reazione di retrotrascrizione (sintesi di cDNA con random primers) (test richiesti/anno comprensivi di controlli positivi e negativi = n. 1800)

Si richiede test per l'allestimento di reazione di retrotrascrizione a partire da RNA estratto da campioni di sangue midollare e sangue periferico; la sintesi di cDNA deve essere effettuata utilizzando random primers
Il kit deve contenere tutti i reagenti (enzimi, plastiche)
Si richiede certificazione CE e IVD

**4) Determinazione quantitativa del gene WT1
(test richiesti/anno comprensivi di controlli positivi, negativi e standard = n. 280)**

Si richiede fornitura di test diagnostico per la quantificazione del gene WT1 a partire da cDNA ottenuto da campioni di midollo osseo e/o sangue periferico. I reagenti (primers, probes e plasmidi per curva standard) devono essere conformi ai protocolli europei ELN.

Il test deve essere validato su strumentazione ABI Prism TaqMan di proprietà e dotato di certificazione CE e IVD.

Si richiede

- test completo di miscele di amplificazione contenenti l'enzima, sonde e primers specifici, curve standard a numero noto
- disponibilità di curva standard in grado di rilevare basse quantità di molecole WT1.
- presenza di un normalizzatore per la fluorescenza di fondo

**5) Determinazione del riarrangiamento bcr-abl associato alla t(9;22)
(test richiesti/anno comprensivi di controlli positivi e negativi = n. 450)**

Si richiede fornitura di un test diagnostico qualitativo per il rilevamento dei trascritti di fusione bcr-abl p190 e p210 associati alla traslocazione t(9;22).

Il saggio offerto deve utilizzare come materiale di partenza RNA totale estratto da sangue midollare e/o sangue periferico.

La metodica deve essere comprensiva sia di un sistema di controllo di idoneità del campione (gene di controllo) sia di controlli positivi per le varianti ricercate e deve essere completo di tutto il necessario per l'allestimento del test.

Si richiede certificazione CE-IVD.

**6) Determinazione del riarrangiamento PML/RARa associato alla t(15;17)
(test richiesti/anno comprensivi di controlli positivi e negativi = n. 230)**

Si richiede fornitura di test come saggio qualitativo di amplificazione in nested PCR in base al protocollo Biomed1 (Leukemia 1999); l'indagine deve poter individuare i riarrangiamenti PML-RARa (varianti bcr1, bcr2, bcr3) correlati alla presenza della traslocazione t(15;17) a partire da cDNA ottenuto da campioni di sangue midollare e/o sangue periferico.

Il test deve essere comprensivo sia di un sistema di controllo di idoneità del campione (gene di controllo) sia di controlli positivi per ogni tipo di variante ricercata; deve inoltre essere completo di tutti i reagenti necessari per l'allestimento delle reazioni di PCR.

Si richiede certificazione CE-IVD.

Si richiede che sia prevista la fornitura separata dei controlli positivi.

**7) Determinazione del riarrangiamento AML1/ETO associato alla t(8;21)
(test richiesti/anno comprensivi di controlli positivi e negativi = n. 80)**

Si richiede fornitura di test come saggio qualitativo di amplificazione in nested PCR in base al protocollo Biomed1 (Leukemia 1999); l'indagine deve poter individuare il riarrangiamento AML-ETO, traslocazione t(8;21) a partire da cDNA ottenuto a partire da campioni di sangue midollare e/o sangue periferico.

Il test deve essere comprensivo sia di un sistema di controllo di idoneità del campione (gene di controllo) sia di controlli positivi per ogni tipo di variante ricercata; deve inoltre essere completo di tutti i reagenti necessari per l'allestimento delle reazioni di PCR.

Si richiede certificazione CE-IVD.

Si richiede che sia prevista la fornitura separata dei controlli positivi.

8) Determinazione del riarrangiamento CBFb-MYH11 associato alla inv(16)

(test richiesti/anno comprensivi di controlli positivi e negativi = n. 60)

Si richiede fornitura di test come saggio qualitativo di amplificazione in nested PCR in base al protocollo Biomed1 (Leukemia 1999); l'indagine deve poter individuare i riarrangiamenti CBFb-MYH11 associati alla inv(16) nelle varianti tipo A, tipo D, tipo E a partire da cDNA ottenuto a partire da campioni di sangue midollare e/o sangue periferico di pazienti affetti da AML.

Il saggio deve essere comprensivo sia di un sistema di controllo di idoneità del campione (gene di controllo) sia di controlli positivi per ogni tipo di variante ricercata.

Il saggio deve essere completo di tutti i reagenti necessari per l'allestimento delle reazioni di PCR

Si richiede certificazione CE-IVD.

Si richiede che sia prevista la fornitura separata dei controlli positivi.

9) Determinazione delle mutazioni di FLT3 : ITD e D835

(test richiesti/anno comprensivi di controlli positivi e negativi = n. 260)

Il test deve consentire l'identificazione della ITD (internal tandem duplication) e della mutazione TDK (D835) del gene FTL3 (FMS-like receptor tyrosine kinase), mediante PCR con oligonucleotidi specifici e successiva digestione enzimatica con l'enzima Eco RV per la mutazione TDK

Si richiede certificazione CE-IVD.

Il test deve partire da campioni di DNA e deve prevedere un sistema di rilevazione rapido degli amplificati, adeguato all'esigenze di alta sensibilità e di automazione

Il test deve comprendere tutti i reattivi necessari per l'esecuzione dell'analisi, master mix pronte all'uso per ITD e TKD e un sistema di controllo dell'integrità del campione., deve avere uno stesso profilo termico per entrambe le mutazioni ed inoltre deve contenere controlli positivi e negativi.

Al test si richiede una Sensibilità minima di 5×10^{-2}

La ditta deve fornire come parte integrante della proposta tutto i reagenti necessari e indispensabile all'esecuzione del test (Taq polimerasi; Enzima di restrizione).

10) Analisi di clonalità dei Linfociti B (riarrangiamenti IgH) in PCR qualitativa

(test richiesti/anno comprensivi di controlli positivi e negativi = n. 80)

Il kit deve consentire l'analisi di clonalità della catena pesante delle immunoglobuline (IgH) mediante studio del riarrangiamento genico VDJ nelle tre regioni: FR1JH-FR2JH-FR3JH (Framework)) e la possibilità di eseguire lo studio del riarrangiamento incompleto D (diversity) e J (joining) a partire da DNA.

I test devono essere progettati secondo le Linee Guida Europee "BIOMED-2 Concerted Action"

Il test deve comprendere tutti i reattivi necessari per l'esecuzione dell'analisi, master mix pronte all'uso per FR1-JH,FR2-JH,FR3-JH ,DH-JH e un sistema di controllo interno di qualità del DNA che consenta di verificare l'idoneità del campione, l'efficacia dell'estrazione e dell'amplificazione evitando così i falsi negativi

I riarrangiamenti devono essere eseguibili contemporaneamente con lo stesso profilo termico ed inoltre il kit deve contenere controlli di DNA monoclonale e policlonale .

Il test deve partire da campioni di DNA e deve prevedere una fase di rivelazione rapida degli amplificati mediante analisi di frammenti con elettroforesi capillare compatibile con strumentazione ABI 3500dx di proprietà.

Al test si richiede una Sensibilità minima di 1×10^{-2}

La ditta deve fornire come parte integrante della proposta tutto i reagenti necessari e indispensabile all'esecuzione del test (Taq polimerasi).

Si richiede certificazione CE-IVD.

11) Analisi di clonalità dei Linfociti T (riarrangiamenti tcr gamma) in PCR qualitativa

(test richiesti/anno comprensivi di controlli positivi e negativi = n. 165)

Il test deve consentire l'analisi di clonalità del TCR GAMMA mediante la tecnica PCR, si preferisce l'utilizzo di singola master mix per tutti i riarrangiamenti funzionali del gene TCR gamma: $V\gamma 1-11$ con primer fluorescenti a partire da DNA

Il test deve comprendere tutti i reattivi necessari per l'esecuzione dell'analisi, master mix pronte all'uso, possibilità di controllo interno di qualità del DNA che consenta di verificare l'idoneità del campione, l'efficacia dell'estrazione e dell'amplificazione evitando così i falsi negativi e controllo DNA monoclonale e policlonale all'interno del saggio.

Deve prevedere fase di rivelazione rapida degli amplificati mediante analisi di frammenti con elettroforesi capillare compatibile con ABI 3500dx di proprietà.

Al test si richiede una Sensibilità minima di 5×10^{-2}

La ditta deve fornire come parte integrante della proposta tutto i reagenti necessari e indispensabile all'esecuzione del test (Taq polimerasi).

Si richiede certificazione CE-IVD.

**12) Determinazione della mutazione V617F del gene JAK2
(test richiesti/anno comprensivi di controlli positivi, negativi e standard = n. 700)**

Si richiede un sistema che consenta l'analisi quantitativa della mutazione JAK2V617F a partire da DNA. Il test deve essere validato su strumentazione Real Time ABIPrism di proprietà.

Il test deve contenere primer, probe e standard di riferimento a diverse diluizioni sia per la sequenza Wild type che per la sequenza mutata; si richiede che il test contenga un controllo positivo ed un controllo negativo.

Il sistema deve essere in grado di esprimere il risultato dell'analisi come Allelic Burden (% della sequenza portatrice della mutazione sul totale delle sequenza WT + MUT).

La ditta deve fornire come parte integrante della proposta tutti i reagenti necessari e indispensabile all'esecuzione del test.

Si richiede certificazione CE-IVD.

**13) Rilevazione della traslocazione t(14;18) BCL2/JH in PCR qualitativa
(test richiesti/anno comprensivi di controlli positivi e negativi= n. 300)**

Il test deve identificare, mediante l'uso della polymerase chain reaction (PCR), i due possibili riarrangiamenti MBR e mcr (BCL2) della t(14;18) con nested PCR e rilevazione su gel d'agaroso

Il test deve comprendere tutti i reattivi necessari per l'esecuzione dell'analisi, compresi i controlli positivi e il gene di controllo dell'integrità del campione

Si richiede certificazione CE-IVD.

**14) Rilevazione della traslocazione t(11;14) BCL1/JH in PCR qualitativa
(test richiesti/anno comprensivi di controlli positivi e negativi= n. 240)**

Il test deve permettere l'individuazione della riarrangiamento t(11;14) (q13;q32), regione mtc/jh utilizzando la tecnica della PCR e nested PCR e con rilevazione su gel d'agaroso

Il test deve comprendere tutti i reattivi necessari per l'esecuzione dell'analisi, compresi i controlli positivi e il gene di controllo dell'integrità del campione.

Si richiede certificazione CE-IVD.

STRUMENTAZIONI ACCESSORIE CHE DEVONO ESSERE FORNITE IN COMODATO D'USO

La ditta offerente dovrà includere la seguente dotazione strumentale in comodato d'uso:

1) n° 1 spettrofotometro UV-Vis

per misurare concentrazione e purezza di DNA, RNA e proteine

il dosaggio deve poter essere effettuato a partire da bassi volumi di campione (1microL), in tempi rapidi e senza diluizioni anche per campioni molto concentrati

Lo strumento deve calcolare le ratio di purezza (260/280 e 260/230)

Lo strumento deve prevedere la possibilità di esportare i dati (file tipo Excel)

Lo strumento deve essere completo di PC, tastiera, mouse

2) n°1 Centrifuga con le caratteristiche di seguito specificate:

Centrifuga da banco

Possibilità di impostare in modo semplice e veloce il timer e la velocità di centrifugazione.

Dotata di n.2 rotori:

- Rotore a tenuta aerosol per almeno n.20 provette da 1,5/2ml (velocità max almeno 13.000 rpm)

- Rotore basculante per n.2 piastre PCR (96 pozzetti)

Dotata di sistema di riconoscimento automatico del rotore

Dotata di sistema automatico di rilevazione di rotore non equilibrato.

Dotata di display per la visualizzazione dei parametri

Possibilità di impostare in modo semplice e veloce i parametri (velocità e tempo)

Possibilità di memorizzazione programmi

Ridotta rumorosità

Ergonomica e dimensioni compatte (ingombro max 30 larg x 40 prof x 25 h)

Centrifuga completa di tutti i componenti e accessori (contenitori, adattatori, coperchi, ecc. per provette e piastre) indispensabili per il pieno e sicuro utilizzo.

La ditta dovrà esplicitare le procedure di manutenzione ordinaria ad opera del personale utilizzatore.

La ditta dovrà esplicitare le procedure di pulizia e disinfezione delle apparecchiature e specificare nel dettaglio le sostanze utilizzabili per la pulizia, disinfezione e sanificazione.

3) n°1 Micro-centrifuga con le caratteristiche di seguito specificate:

Micro-centrifuga da banco da utilizzare nell'allestimento delle reazioni di PCR

Dotata di n.2 rotori di seguito descritti: (1 rotore per provette da 1,5/2,0ml con adattatori per provette piccole da 0,2/0,6ml e 1 rotore per almeno n.2 strip da 8 da PCR tubes 0,2 ml)

Micro-centrifuga completa di tutti i componenti e accessori (contenitori, adattatori, coperchi, ecc. per PCR tubes) indispensabili per il pieno e sicuro utilizzo.

La ditta dovrà esplicitare le procedure di manutenzione ordinaria ad opera del personale utilizzatore.

La ditta dovrà esplicitare le procedure di pulizia e disinfezione delle apparecchiature e specificare nel dettaglio le sostanze utilizzabili per la pulizia, disinfezione e sanificazione.

ELENCO STRUMENTAZIONE DISPONIBILE PRESSO IL LABORATORIO

- Estrattore acidi nucleici Maxwell PROMEGA
- Realtime AB 7900
- Realtime AB 7300
- Sequenziatore ABI 3500 ABI310
- Termociclatori AB 9700, 2720, Verity
- Vaschette elettroforetiche Biorad
- Alimentatore per vaschette elettroforetiche Biorad
- Sistema di acquisizione immagine Biorad GelDoc

Qualora per l'esecuzione e validazione dei test offerti sia necessario l'utilizzo di strumentazioni non disponibili in laboratorio, le strumentazioni supplementari dovranno essere contestualmente fornite in comodato d'uso .

CRITERI DI VALUTAZIONE QUALITATIVA

Il valore tecnico e prestazionale dei **Kit Diagnostici** al di là dei requisiti minimi deve essere riferito ai seguenti elementi di giudizio

Parametro	Criterio di assegnazione del punteggio	Punti max
<p>Analisi quantitativa Riarrangiamento bcr-abl p210 Riarrangiamento bcr-abl p190</p> <p>Complessità operativa, sistema di analisi dei dati</p>	<p>il punteggio sarà assegnato in proporzione al minor numero di passaggi operativi per l'esecuzione del test, in proporzione a praticità e rapidità d'esecuzione e analisi (es minor impegno tecnico nei vari passaggi) e in base alla presenza di sistema di analisi dei dati che garantisca una semplificazione nell'interpretazione dei risultati e una refertazione più rapida</p>	4
<p>Reazione di retro trascrizione</p> <p>Complessità operativa</p>	<p>il punteggio sarà assegnato in proporzione al minor numero di passaggi operativi per l'esecuzione del test, in proporzione a praticità e rapidità d'esecuzione e analisi (es minor impegno tecnico nei vari passaggi)</p>	3
<p>Determinazione quantitativa del gene WT1</p> <p>Sensibilità</p>	<p>Il punteggio sarà assegnato in proporzione all'uso di primer e probe progettati secondo studi ELN e alla disponibilità di curva standard per WT1 in grado di rilevare basse quantità del gene WT1</p>	5
<p>Ricerca riarrangiamento bcra-abl (per screening)</p> <p>Complessità operativa, metodo/ velocità di rilevazione degli amplificati, possibilità di refertazione in tempi rapidi</p>	<p>Il punteggio sarà assegnato in proporzione al minor numero di passaggi operativi per l'esecuzione del test, in proporzione a praticità e rapidità d'esecuzione e analisi (es minor impegno tecnico nei vari passaggi) e in base alla presenza di un sistema di rilevazione rapido degli amplificati</p>	8
<p>Analisi qualitativa: riarrangiamento PML-RARa riarrangiamento CBFb_MYH11 riarrangiamento AML1/ETO</p> <p>Complessità operativa, sensibilità diagnostica</p>	<p>Il punteggio sarà assegnato in proporzione al minor numero di passaggi operativi per l'esecuzione del test, in proporzione a praticità e rapidità d'esecuzione, analisi (es minor impegno tecnico nei vari passaggi) alla maggiore sensibilità e alla presenza di un test che permetta una diagnosi rapida del riarrangiamento PML-RARa.</p>	6
<p>Determinazione delle mutazioni di FLT3 : ITD e D835</p> <p>Complessità operativa, sensibilità diagnostica e metodo di rilevazione degli amplificati</p>	<p>Il punteggio sarà assegnato in proporzione al minor numero di passaggi operativi per l'esecuzione del test, in proporzione a praticità e rapidità d'esecuzione e analisi (es minor impegno tecnico nei vari passaggi) alla maggiore sensibilità e in base alla presenza di un sistema di rilevazione più rapido e specifico degli amplificati, adeguato all'esigenze di ridotta manualità operativa del laboratorio</p>	8
<p>RIARRANGIAMENTO IGH</p> <p>Complessità operativa, sensibilità e completezza diagnostica</p>	<p>Il punteggio sarà assegnato in proporzione al minor numero di passaggi operativi per l'esecuzione del test, in proporzione a praticità e rapidità d'esecuzione e analisi (es minor impegno tecnico nei vari passaggi) alla maggiore sensibilità e alla possibilità di eseguire lo studio del riarrangiamento incompleto D (diversity) e J (joining)</p>	6

Parametro	Criterio di assegnazione del punteggio	Punti max
<p>RIARRANGIAMENTO TCR gamma</p> <p>Complessità operativa, sensibilità e sistema di analisi dei dati</p>	<p>Il punteggio sarà assegnato in proporzione al minor numero di passaggi operativi per l'esecuzione del test, in proporzione a praticità e rapidità d'esecuzione e analisi (es minor impegno tecnico nei vari passaggi) alla maggiore sensibilità e in base alla presenza di sistema di analisi dei dati che garantisca una semplificazione nell'interpretazione dei risultati e una refertazione più rapida</p>	6
<p>Determinazione della mutazione V617F del gene JAK2</p> <p>Sensibilità</p>	<p>il punteggio sarà assegnato in proporzione a praticità e rapidità d'esecuzione e analisi (es minor impegno tecnico nei vari passaggi) e alla maggiore sensibilità e alla disponibilità di curve standard in grado di rilevare basse quantità dell'allele JAK2WT e dell'allele JAK2 MUT</p>	7
<p><u>ANALISI LINFOMI B</u></p> <p>Kit per la rilevazione qualitativa della traslocazione t(14;18) BCL2/JH e t(11;14) BCL1/JH</p> <p>Complessità operativa e sensibilità</p>	<p>il punteggio sarà assegnato in proporzione al minor numero di passaggi operativi per l'esecuzione del test, in proporzione a praticità e rapidità d'esecuzione e analisi (es minor impegno tecnico nei vari passaggi) e alla maggiore sensibilità</p>	2
<p>Formazione e assistenza tecnica per l'utilizzo dei kit</p> <p>Formazione ed assistenza tecnica telefonica post vendita agli utilizzatori.</p> <p>Formazione del personale in loco sulla parte tecnica di allestimento delle sedute analitiche e sull'interpretazione dei risultati.</p> <p>Formazione e aggiornamento continuo del personale (relazionare e documentare)</p>	<p>Il punteggio sarà assegnato in proporzione:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ai minori tempi di intervento dalla chiamata e di risoluzione del guasto dalla chiamata, e alla maggiore disponibilità - al n° ore di formazione residenziale in loco - al numero di eventi formativi indicati - numero di centri presso cui è presente analoga fornitura 	5