



REGIONE CAMPANIA
AZIENDA OSPEDALIERA DI RILIEVO NAZIONALE E DI ALTA SPECIALIZZAZIONE
"SANT'ANNA E SAN SEBASTIANO"
CASERTA

Determina Dirigenziale N. 530 del 10/08/2020

Proponente: Il Direttore UOC PROVVEDITORATO ED ECONOMATO

Oggetto: FORNITURE PER UOC PATOLOGIA CLINICA/ UOSD GENETICA MEDICA E BIOLOGIA MOLECOLARE - AGGIORNAMENTO TECNOLOGICO DITTA SCIENTIFIC MEDICAL COMPANY SRL.

PUBBLICAZIONE

In pubblicazione dal 10/08/2020 e per il periodo prescritto dalla vigente normativa in materia (art.8 D.Lgs 14/2013, n.33 e smi)

ESECUTIVITA'

Atto immediatamente esecutivo

TRASMISSIONE

La trasmissione di copia della presente Deliberazione è effettuata al Collegio Sindacale e ai destinatari indicati nell'atto nelle modalità previste dalla normativa vigente. L'inoltro alle UU. OO. aziendali avverrà in forma digitale ai sensi degli artt. 22 e 45 D.gs. n° 82/2005 e s.m.i. e secondo il regolamento aziendale in materia.

UOC AFFARI GENERALI
Direttore Eduardo Chianese

ELENCO FIRMATARI

In Sostituzione Del Dir Uoc Provveditorato Tiziana Simone - UOC PROVVEDITORATO ED ECONOMATO

Per delega del Direttore della UOC AFFARI GENERALI, il funzionario Pasquale Cecere

Oggetto: FORNITURE PER UOC PATOLOGIA CLINICA/ UOSD GENETICA MEDICA E BIOLOGIA MOLECOLARE - AGGIORNAMENTO TECNOLOGICO DITTA SCIENTIFIC MEDICAL COMPANY SRL.

Direttore UOC PROVVEDITORATO ED ECONOMATO

Premesso che

- con Delibera n. 210 del 27.02.2020 è stata disposta la prosecuzione degli effetti giuridici ed economici dei contratti relativi alla fornitura di prodotti per l'UOC Patologia Clinica, UOSD Genetica Medica e Biologia Molecolare fino al 30.09.2020;
- con nota del 27.07.2020 la ditta Scientific Medical Company Srl ha trasmesso la risposta alla richiesta di aggiornamento tecnologico proposto dall'UOSD Genetica e Biologia Molecolare del prodotto aggiudicato nell'ambito della fornitura indicata in oggetto come di seguito indicato (allegato 1);

CODICE PRODOTTO IN USO	CODICE PRODOTTO AGGIORNATO
1.009RT	ONC-01425

- con nota del 31.07.2020 il Direttore dell'UOC Patologia Clinica ha autorizzato il suddetto aggiornamento (allegato 2);

Preso atto che

- il suddetto aggiornamento non comporta aggravio di spesa rimanendo invariate le condizioni economiche di fornitura;

Considerato che

- la presente proposta di determinazione è formulata previa istruttoria ed estensione conformi alla normativa legislativa vigente in materia;

Determina Dirigenziale

Il presente atto, in formato digitale e firmato elettronicamente, costituisce informazione primaria ed originale ai sensi dei combinati disposti degli artt. 23-ter, 24 e 40 del D.Lgs. n. 82/2005. Eventuale riproduzione analogica, costituisce valore di copia semplice a scopo illustrativo.

DETERMINA

1. di prendere atto della comunicazione della ditta Scientific Medical Company Srl relativa all'aggiornamento del codice prodotto aggiudicato nell'ambito della fornitura di prodotti per l'UOC Patologia Clinica, UOSD Genetica Medica e Biologia Molecolare come di seguito indicato;

CODICE PRODOTTO IN USO	CODICE PRODOTTO AGGIORNATO
1.009RT	ONC-01425

2. di precisare che l'aggiornamento è a parità di condizioni economiche contrattuali e, pertanto, il presente provvedimento non comporta incrementi di spesa;
3. di prendere atto dell'autorizzazione in merito al suddetto aggiornamento espressa dal Direttore dell'UOC Patologia Clinica;
4. di incaricare la scrivente UOC di aggiornare il contratto in essere con la succitata Ditta, così da consentire all'UOC Farmacia l'emissione dell'ordinativo;
5. di trasmettere copia del presente atto al Collegio Sindacale, come per legge, all' UOC Farmacia ed all'UOC Patologia Clinica.

Il Direttore UOC Provveditorato ed Economato
Dott.ssa Antonietta Costantini

Determina Dirigenziale

Il presente atto, in formato digitale e firmato elettronicamente, costituisce informazione primaria ed originale ai sensi dei combinati disposti degli artt. 23-ter, 24 e 40 del D.Lgs. n. 82/2005. Eventuale riproduzione analogica, costituisce valore di copia semplice a scopo illustrativo.



REGIONE CAMPANIA
AZIENDA OSPEDALIERA DI RILIEVO NAZIONALE E DI ALTA SPECIALIZZAZIONE
“SANT'ANNA E SAN SEBASTIANO”
CASERTA

Determina Dirigenziale

Il presente atto, in formato digitale e firmato elettronicamente, costituisce informazione primaria ed originale ai sensi dei combinati disposti degli artt. 23-ter, 24 e 40 del D.Lgs. n. 82/2005. Eventuale riproduzione analogica, costituisce valore di copia semplice a scopo illustrativo.

ALLEGATO N.1

Oggetto **Re: Aggiornamento kit**
Mittente <esseemmeci@virgilio.it>
Destinatario provveditorato@ospedale.caserta.it
<provveditorato@ospedale.caserta.it>
Cc patologiaclinica@ospedale.caserta.it
<patologiaclinica@ospedale.caserta.it>,
geneticaebiologiamolecolare@ospedale.caserta.it
<geneticaebiologiamolecolare@ospedale.caserta.it>
Data 27/07/2020 16:20
Priorità Normale



-
- Aggiornamenti Kit Calreticulina.pdf(~233 KB)
 - ONC 014 QUALITAT CALR-VER2.pdf(~359 KB)
-

Spett. Dr.ssa Costantini,

in allegato comunicazione di proposta aggiornamento tecnologico richiesto dalla U.O.S.D Genetica e Biologia Molecolare.

cordiali saluti

Il 16/07/2020 13:46 BIOLOGIA MOLECOLARE
<geneticaebiologiamolecolare@ospedale.caserta.it> ha scritto:

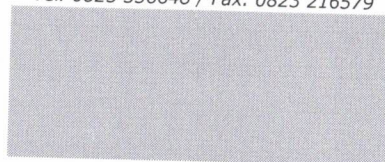
In allegato richiesta aggiornamento diagnostico

S m C

s c i e n t i f i c m e d i c a l c o m p a n y s r l

Largo Daniel Bovet, 1 - 81100 Caserta

Tel. 0823 356648 / Fax. 0823 216579



SmC

scientific medical company

Spett. A.O.R.N Caserta

c.a. Dr.ssa Antonietta Costantini

Dr. Arnolfo Petruzzello

Dr.ssa Milena Schioppa

Oggetto: Aggiornamento tecnologico kit CALRETICULINA

In risposta alla richiesta inoltrata via mail in data 16/07/2020 relativamente all'oggetto, considerato che il prodotto in oggetto,

- Calreticulina – codice 1.009RT da 25 test (CND W01060299 – REP. 1415572)

prezzo € 1.068,75 a confezione

prezzo a test € 42,75.

oggetto di aggiudicazione, giusto Delibera n. 210 del 27/02/2020 – rif. Contratto 4600022369 proponiamo, come aggiornamento il kit:

- Calreticulina – codice ONC-01425 da 25 test (CND 01060299 – REP. 1761183)

prezzo a confezione di € 1.068,75

prezzo a test di € 42,75.

che dichiara, come richiesto, sensibilità e specificità alla pagina 5 del manuale in allegato.

Restiamo in attesa di un vostro cortese riscontro.

Cordiali saluti

Sm C | scientific medical company srl
largo daniel bovet 1
81100 caserta | italy
t +390823356648
f +390823216579
e esseemeci@virgilio.it
pi 02012610610



smc

scientific medical company

smc | scientific medical company srl
largo daniel bovet 1
81100 caserta | italy
t +390823356648
f +390823216579
e esseemmeci@virgilio.it | esseemmeci@legalmail.it
pi 02012610610

MUTAZIONE Tipo I (Del 52bp) e Tipo II (Ins 5bp) ESONE 9 GENE CALR (chaperone calreticulin)

IVD Per uso diagnostico in vitro



Key words: sindromi mieloproliferative BCR/ABL neg-

1. INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

Determinazione qualitativa della mutazione ins 5bp/del 52bp dell'esone 9 del gene CALR (chaperone calreticulin) mediante tecnica Real-Time PCR. Kit ottimizzato per strumenti Biorad CFX96 e Agilent AriaDx.

Catalogo #	Reazioni
ONC-014-25	50 (25 x 2)
ONC-014-50	100 (50 x 2)

2. CONTENUTO DEL KIT

Descrizione	Etichetta	50 Reazioni	100 Reazioni
Mix probes e oligonucleotidi	Mix Ins 5bp CALR 10 X	1 x 70 µl	1 x 140 µl
Mix probes e oligonucleotidi	Mix Del 52bp CALR 10 X	1 x 70 µl	1 x 140 µl
Mix buffer ed enzima	Mix Real-Time PCR 5X	1 x 280 µl	1 x 560 µl
H ₂ O deionizzata	H ₂ O deionizzata	2 x 1 ml	2 x 1 ml
DNA ricombinante o genomico	Controllo positivo 1 Ins 5bp CALR Del 52bp CALR	1 x 15 µl	1 x 20 µl



Ogni componente del kit deve essere conservato alla temperatura indicata sull'etichetta della scatola quando non in uso.

I reagenti conservati alla temperatura indicata sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del kit. Per alcuni reagenti del kit deve essere evitata l'esposizione al calore e alla luce che potrebbero incidere negativamente sulla data di scadenza. Se un controllo Positivo, negativo o un valore risulta al di fuori del valore atteso, i risultati non sono da ritenersi validi ed i campioni devono essere processati nuovamente.

3. PRECAUZIONI D'USO

Questo kit è un Dispositivo Diagnostico in vitro (IVD) e deve essere utilizzato esclusivamente da personale qualificato ed esperto nell'uso di tecniche di biologia molecolare applicate alla diagnostica.

Prima di utilizzare il kit:

Leggere attentamente il contenuto di questo manuale di istruzioni.

Utilizzare tutti i Dispositivi di protezione individuali necessari (DPI), guanti monouso, camici da laboratorio, cappa a flusso laminare e lavare accuratamente le mani.

Utilizzare le buone pratiche di laboratorio. Non mangiare, bere, fumare, etc. nei laboratori.

Non pipettare con la bocca. Non utilizzare il kit oltre la data di scadenza. Non miscelare reagenti di kit o lotti diversi.

Per limitare il rischio di contaminazione da acidi nucleici o campioni sintetici positivi a causa di aerosol formati durante le varie fasi di pipettaggio, le pipette devono esclusivamente essere dedicate alle zone di lavoro ed usate con puntali dotati di barriera anti-aerosol. E' necessario sostituire i puntali ad ogni trasferimento di liquidi.

Organizzare gli spazi di lavoro in diverse zone, separando gli spazi pre e post-PCR.

Preparare rapidamente la miscela di reazione a temperatura ambiente o in alternativa su un blocco di raffreddamento.

Sostituire frequentemente i guanti; lavare le superfici con del disinfettante come ipoclorito di sodio al 5% asciugando la superficie con etanolo al 70% ; utilizzare alla fine di ogni ciclo di lavoro lampade UV per 180 min.

Smaltire tutti i campioni, i reagenti non utilizzati e i confezionamenti in conformità con le normative locali. Prestare particolare attenzione all'adeguatezza dei campioni biologici da processare (non si consiglia l'utilizzo di campioni con eparina essendo un inibitore della reazione). I campioni biologici possono essere potenzialmente infettivi. **Per qualsiasi dubbio sulla procedura del kit e per qualsiasi problematica tecnica, contattare il supporto tecnico della BioMol Laboratories s.r.l. all'indirizzo email: biomol.laboratories@biomollaboratories.com**

4. MATERIALE RICHIESTO NON FORNITO NEL KIT

STRUMENTI

Cappa a flusso laminare (è consigliato l'uso dedicato di una cappa a flusso laminare per la preparazione delle mix e di un'ulteriore cappa a flusso laminare per aggiungere/dispensare il DNA genomico); microcentrifuga da 12.000/16.000 RPM per tubi da 1,5/2ml; agitatore (vortex); sistema di Real-Time PCR; bagnomaria; frigorifero e congelatore; pipette a volume variabile da 0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL.

REAGENTI

Kit di Estrazione del DNA Genomico (validato IVD-CE).

MATERIALE VARIO

Guanti monouso senza talco; contenitore per rifiuti Biohazard; puntali per pipette RNase/DNase free con filtro anti-aerosol, idonei al modello di pipette; provette-piastre di PCR adatte al modello di sistema di Real-Time PCR, portaprovette.

5. BASI SCIENTIFICHE

Le neoplasie mieloproliferative (MPN) sono neoplasie ematologiche caratterizzate dalla proliferazione di uno o più linee mieloidi: granulocitica, eritroide, megacariocitica e/o mastocitaria.

Secondo i criteri dell'Organizzazione Mondiale della Sanità 2016, la classificazione delle MPN comprende sette sottocategorie: leucemia mieloide cronica (LMC), leucemia neutrofila cronica, policitemia vera (PV), mielofibrosi primaria (PMF), trombocitemia essenziale (ET), leucemia eosinofila cronica - non altrimenti specificata e MPN, non classificabile (MPN-U).

La policitemia vera (PV), la mielofibrosi idiopatica (PMF) e la trombocitemia essenziale (ET) mostrano caratteristiche fenotipiche condivise (MPN BCR/ABL neg) che sono la conseguenza dell'attivazione costitutiva diretta o indiretta di JAK2, la tirosin-chinasi affine ai recettori del fattore di crescita ematopoietico per l'eritropoietina (EPOR) e la trombopoietina (MPL) ed al recettore G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor).

L'attivazione diretta di JAK2 è causata da una mutazione puntiforme (V617F nell'esone 14 JAK2) o, meno comunemente, da inserzioni o delezioni nell'esone 12 del gene JAK2.

L'attivazione indiretta di JAK2 è causata da mutazioni puntiformi nel recettore della trombopoietina, MPL o da mutazioni nel gene CAL chaperone calreticulin (CALR) che consentono di legare MPL e attivare JAK2 indirettamente.

CALR è una proteina multi-funzionale (Ca²⁺-binding protein) con attività di chaperone, localizzata principalmente nel reticolo endoplasmatico (ER). Mutazioni somatiche di CALR sono spesso rappresentate da delezioni/inserzioni nell'esone 9 e generano una mutazione "frameshift" sulla cornice di lettura risultante in una nuova sequenza amminoacidica al dominio carbossi-terminale della proteina. La proteina mutata, inoltre, perde il segnale KDEL, necessario per la localizzazione della proteina nel reticolo endoplasmatico.

Le due mutazioni più frequenti corrispondono a una delezione di 52 bp (p.L367fs*46), chiamata anche tipo 1 e una inserzione di 5 bp (p.K385fs*47), chiamata anche tipo 2. Le mutazioni CALR si presentano solitamente allo stato eterozigote anche se sono stati osservati pochi casi di mutazioni allo stato omozigote, più spesso per le mutazioni di tipo 2.

Referenze

- ❖ Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. Blood. 2017 Feb 9;129(6):667-679. Review.
- ❖ Mutations in MPNs: prognostic implications, window to biology, and impact on treatment decision. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2016 Dec 2;2016(1):552-560.
- ❖ The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. Blood Cancer J. 2018 Feb 9;8(2):15. doi: 10.1038/s41408-018-0054-y. Review.
- ❖ Essential thrombocythemia: a review of the clinical features, diagnostic challenges, and treatment modalities in the era of molecular discovery. Leuk Lymphoma. 2017 Dec;58(12):2786-2798. doi: 10.1080/10428194.2017.1312371. Epub 2017 May 15. Review

Mutazioni Somatiche nelle MPN BCR/ABL neg -			
Gene	Posizione	Mutazione	Frequenza
JAK2	9p24	JAK2 V617F JAK2 esone 12	95% PV, 50-60% PMF e ET 3% PV
MPL	1p34	MPLS15 L/K/A/R MPLS505N	2-3% ET 3-5% PMF
CALR	19p13	Ins/Del esone 9	20-25% ET, 25-30% PMF

SIGNIFICATO CLINICO

Le nuove conoscenze molecolari nell'ambito delle MPN cromosoma-Philadelphia negative hanno consentito di individuare nella mutazione Ins 5bp/Del 52bp dell' esone 9 del gene CALR un criterio diagnostico da inserire nella routine di laboratorio in caso di sospetta MPN JAK2 MUT negativa (come suggerito dai criteri diagnostici del WHO (World Health Organization; Tefferi et al., Leukemia 2008).

PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo utilizza la tecnica della reazione a catena della polimerasi PCR (Polymerase Chain Reaction) che permette l'amplificazione in vitro di una sequenza specifica del DNA (sequenza target) e la successiva identificazione di mutazioni genetiche attraverso l'utilizzo di probes specifici coniugati a fluorocromi (discriminazione allelica). La rivelazione avviene in fluorescenza su un sistema di Real-Time PCR. La specificità del metodo è valutata con adeguati controlli forniti nel kit.

6. DESCRIZIONE DEL KIT

Il prodotto ONC-014 consente la determinazione qualitativa delle mutazioni Ins 5bp e Del 52bp dell' esone 9 del gene CALR mediante tecnica Real-Time PCR.

L'amplificazione è effettuata su DNA genomico estratto da sangue intero, da tessuto, da cellule etc.

7. PROTOCOLLO DI AMPLIFICAZIONE

ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO: è possibile utilizzare qualsiasi metodo (validato IVD-CE) per l'estrazione del DNA genomico da sangue intero, da tessuto, da siero, da cellule etc. E' importante ricordare che i campioni di sangue devono essere raccolti in EDTA o citrato come anticoagulanti e non in eparina che potrebbe inibire l'enzima Taq- polymerase.

Il controllo positivo del kit deve essere trattato come un campione già estratto. Ogni campione deve essere amplificato con entrambe le mix PCR.

PREPARAZIONE MIX PCR: scongelare la Mix PCR 5X, le Mix Ins 5bp CALR 10 X e Mix Del 52bp CALR 10 X. Seguire il seguente schema:

COMPONENTI	1 REAZIONE
Mix PCR 5X	5 µl
Mix Ins 5bp CALR 10X	2,5 µl
H ₂ O deionizzata	12,5 µl

COMPONENTI	1 REAZIONE
Mix PCR 5X	5 µl
Mix Del 52bp CALR 10X	2,5 µl
H ₂ O deionizzata	12,5 µl

Moltiplicare i volumi considerando il numero dei campioni, del controllo positivo del kit e dell'eventuale controllo NTC (no template control). E' consigliabile preparare N. reazioni + 1 in eccesso ed effettuare i campioni in duplicato.

Distribuire 20 µl di mix PCR in ciascun tubo PCR o pozzetto della piastra precedentemente preparato ed aggiungere 5 µl di DNA genomico estratto (50-100 ng/µl) e del controllo positivo del kit.

Il kit contiene quantità sufficienti di controllo positivo per effettuare tre sedute analitiche indipendenti.

8. IMPOSTAZIONE STRUMENTO REAL-TIME

Impostare lo strumento nei canali di fluorescenza FAM e JOE-HEX (reporter dye: FAM e JOE-HEX, quencher dye: none). Le sonde Ins 5bp CALR e Del 52bp CALR sono coniugate al fluorocromo FAM; la sonda controllo interno è coniugata al fluorocromo JOE-HEX.

Impostare sul sistema di Real-Time PCR il seguente profilo termico ed eseguire la reazione di amplificazione:

1 ciclo	95 °C 10 min		
50 cicli	95°C 15 sec	60 °C 1 min	Lettura a 60°C

9. ANALISI DEI DATI

Ogni campione è analizzato con le due diverse mix PCR, Mix Ins 5bp CALR 10 X e Mix Del 52bp CALR 10 X.

Le mix PCR contengono primers-probes specifici per identificare le mutazioni CALR, ma anche primers-probes necessari all'amplificazione di un controllo interno (per valutare la qualità del DNA genomico).

I risultati possibili sono quelli riportati nella tabella sottostante:

MIX	CANALE FAM	CANALE JOE-HEX	GENOTIPO	INTERPRETAZIONE RISULTATO
	Negativo	Negativo		RIPETERE ESTRAZIONE DNA NON VALIDO
Ins 5bp CALR	Negativo	Positivo	ASSENZA DI MUTAZIONE	VALIDO
Ins 5bp CALR	Positivo	Positivo	PRESENZA DI MUTAZIONE	VALIDO
Del 52bp CALR	Negativo	Positivo	ASSENZA DI MUTAZIONE	VALIDO
Del 52bp CALR	Positivo	Positivo	PRESENZA DI MUTAZIONE	VALIDO
Ins 5bp CALR Del 52bp CALR	Positivo	Positivo	CONTROLLO POSITIVO	VALIDO

Sensibilità analitica: $\geq 0,025$ ng di DNA genomico (~ 2 copie); $\geq 2\%$ MUT/WT

Specificità analitica: $\geq 99,9\%$ (garantita dalla specificità degli oligonucleotidi e dei probes e dalle condizioni di PCR)

KEY TO SYMBOLS USED SIMBOLI UTILIZZATI



Batch code



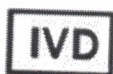
Catalogue number



Use by date



Manufacturer



In vitro diagnostic medical device



European Conformity



Sufficient for <n> tests



Consult Instructions for use



Keep away from sunlight



Temperature limit



Version



Control



Positive Control



Standard 1



Numero di lotto



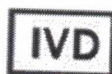
Numero di catalogo



Usare entro



Prodotto da



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Conformità europea



Contenuto sufficiente per <x> tests



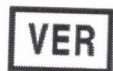
Consultare le istruzioni per l'uso



Tenere lontano dalla luce



Limiti di temperatura



Versione



Controllo



Controllo positivo



Standard 1

*Sig. Messarello
Terme
X affiorare 05/08/2020*

Spett. A.O.R.N Caserta

c.a. Dr.ssa Antonietta Costantini

Dr. Arnolfo Petruzzello

Dr.ssa Milena Schioppa

Oggetto: Aggiornamento tecnologico kit CALRETICULINA

In risposta alla richiesta inoltrata via mail in data 16/07/2020 relativamente all'oggetto,
considerato che il prodotto in oggetto,

- Calreticulina – codice 1.009RT da 25 test (CND W01060299 – REP. 1415572)

prezzo € 1.068,75 a confezione

prezzo a test € 42,75.

oggetto di aggiudicazione, giusto Delibera n. 210 del 27/02/2020 – rif. Contratto 4600022369

proponiamo, come aggiornamento il kit:

- Calreticulina – codice ONC-01425 da 25 test (CND 01060299 – REP. 1761183)

prezzo a confezione di € 1.068,75

prezzo a test di € 42,75.

che dichiara, come richiesto, sensibilità e specificità alla pagina 5 del manuale in allegato.

Restiamo in attesa di un vostro cortese riscontro.

Cordiali saluti

*31/7/2020
in autunno*



T. pere

Sm C | scientific medical company srl
largo daniel bovet 1
81100 caserta | italy
t +390823356648
f +390823216579
e esseemmeci@virgilio.it
pi 02012610610

