



Assay Technologies Ltd.

Kit per le mutazioni di ESR1 di APIS

Manuale



Kit per le mutazioni di ESR1 di APIS



Manuale



ART0067(05)

Maggio 2024

[www.apisassay.com/
apis-esr1-mutations-
kit](http://www.apisassay.com/apis-esr1-mutations-kit)

REF

Valido per:

02201 (Regno Unito)

02202 (UE)



APIS Assay Technologies Ltd

Second floor, Citylabs 1.0, Nelson Street, Manchester,
M13 9NQ, Regno Unito

Distribuzione APIS:



APIS Assay Technologies Ltd

Second floor, Citylabs 1.0, Nelson Street, Manchester, M13
9NQ, Regno Unito.

+44 (0)161 9388179 – www.apisassay.com

Distribuzione Biocartis:



BIOCARTIS NV

Generaal De Wittelaan 11 B, 2800 Mechelen, Belgio
+32 15 632 888 - www.biocartis.com

Il kit per le mutazioni di ESR1 di APIS è un prodotto da usarsi solo per scopi di ricerca. Non deve essere utilizzato nelle procedure diagnostiche.

Tutte le informazioni contenute nel presente manuale erano corrette al momento della stampa. APIS continua tuttavia a migliorare i propri prodotti e si riserva il diritto di modificare le specifiche, i dispositivi e le procedure di manutenzione in qualsiasi momento e senza preavviso.

Indice

Indice	2
1. Uso previsto	3
2. Descrizione del prodotto	3
3. Materiale fornito	4
3.1 Contenuto del kit	4
4. Materiali necessari ma non forniti.....	4
4.1 Materiali di consumo	4
4.2 Apparecchiature	4
5. Conservazione e manipolazione del reagente.....	4
6. Avvertenze e precauzioni	5
7. Precauzioni generali.....	5
8. Informazioni sulla sicurezza	5
9. Procedura	5
9.1 Montaggio piastra e ciclaggio	5
9.2 Metodo di esecuzione	8
9.3 Impostazione di soglia	8
9.4 Analisi dell'esecuzione.....	8
9.5 Interpretazione dei risultati	9
10. Caratteristiche prestazionali.....	9
10.1 Sensibilità analitica	9
10.2 Intervallo di misurazione	10
10.3 Specificità analitica e reattività crociata	11
11. Risoluzione dei problemi	12
12. Limitazioni.....	12
13. Simboli	12
14. Informazioni di contatto	12
15. Informazioni per gli ordini	12

1. Uso previsto

Il kit per le mutazioni di ESR1 di APIS è un test per la reazione a catena della polimerasi in tempo reale (qPCR) a solo scopo di ricerca (Research Use Only, RUO) per il rilevamento delle mutazioni di ESR1 nell'acido desossiribonucleico (DNA).

Il kit per le mutazioni di ESR1 è un prodotto utilizzato esclusivamente per ricerche di laboratorio basilari. Non deve essere utilizzato nelle procedure diagnostiche.

2. Descrizione del prodotto

Il kit per le mutazioni di ESR1 di APIS utilizza la qPCR con oligonucleotidi legati a un colorante (vale a dire, sonde marcate con un colorante reporter all'estremità 5' e un quencher spegnitore a valle all'estremità 3') per rilevare l'amplificazione della sequenza. Durante la PCR, i primer forward e reverse si ibridano alla sequenza bersaglio del DNA per l'amplificazione, mentre la sonda si lega alla sequenza bersaglio specifica situata tra i primer. Per rilevare selettivamente le mutazioni di ESR1 in un background wild-type (WT) alto, le miscele di primer e sonda (PP) comprendono oligonucleotidi bloccanti, specifici per la sequenza WT del bersaglio, per impedire l'allungamento.

Il kit contiene due miscele di enzimi: una deve essere combinata con le miscele PP 1–4 e la seconda con le miscele PP 5–6. Il kit è provvisto anche di controlli positivi e negativi (PC e NTC) che monitorano la configurazione del test e la performance del reagente. È compreso un controllo di riferimento che rileva il DNA wild-type per assicurare che sia aggiunto un campione adeguato. Nella Tabella 1 sono elencati tutti i bersagli rilevati dal kit di mutazioni di ESR1 di APIS.

Il test è progettato per l'uso con campioni di DNA, ad esempio, DNA libero circolante estratto (cfDNA). Si consiglia di estrarre campioni utilizzando un kit specifico per estrazione di cfDNA e di utilizzare campioni senza diluizione. Per valutare tutte le mutazioni rilevate dal kit occorre un campione di 30 µL.

Tabella 1: Bersagli rilevati dal kit per le mutazioni di ESR1 di APIS (RUO). L536 mutazioni non differenziate.

Miscela reagente	Mutazione	Variazione nucleotidica	COSMIC ID
1	D538G	c.1613A>G	COSM94250
	S463P	c.1387T>C	COSM4771561
2	Y537S	c.1610A>C	COSM1074639
3	Y537C	c.1610A>G	COSM1074637
4	Y537N	c.1609T>A	COSM1074635
	L536H	c.1607T>A	COSM6843697
	L536Q	c.1607_1608delinsAG (TC>AG)	COSM4766050
5	E380Q	c.1138G>C	COSM3829320
	P535H	c.1604C>A	COSM4944018
6	L536R	c.1607T>G	COSM4774826
	L536P	c.1607T>C	COSM6906109
	Riferimento	N/D	N/D

3. Materiali forniti

3.1 Contenuti del kit

**Kit per le mutazioni di ESR1 di APIS
(24 campioni in singlicato + controlli)**

Componente	Colore	Volume
Miscela sonda primer 1	Limpido	1x 189 µL
Miscela sonda primer 2	Limpido	1x 189 µL
Miscela sonda primer 3	Limpido	1x 189 µL
Miscela sonda primer 4	Limpido	1x 189 µL
Miscela sonda primer 5	Limpido	1x 189 µL
Miscela sonda primer 6	Limpido	1x 189 µL
Miscela enzima 1	Giallo	1x 1348 µL
Miscela enzima 2	Viola	1x 706 µL
Controllo positivo (PC)	Nero	1x 128 µL
Controllo senza template (NTC)	Bianco	1x 128 µL

4. Materiali necessari ma non forniti

4.1 Materiali di consumo

- Puntali per pipette con filtro sterili
- Provette sterili per microcentrifuga da 1,5 mL
- Piastre/guarnizioni per PCR o provette compatibili con uno strumento per qPCR

4.2 Apparecchiatura

- Strumento per Real-Time PCR (calibrato per coloranti FAM™ ed HEX™) Per maggiori informazioni sulla calibrazione dello strumento consultare il manuale dell'apparecchiatura.
- Pipette con volume regolabile
- Centrifuga (per la centrifugazione di piastre e provette per microcentrifuga)
- Vortex
- Applicatore pellicola adesiva
- Blocco di raffreddamento o ghiaccio (opzionale)

5. Conservazione e manipolazione del reagente

- Se il kit non è congelato all'arrivo, la confezione esterna è danneggiata o se manca uno qualsiasi dei componenti, contattare APIS Assay Technologies.
- Conservare il kit subito dopo averlo ricevuto a temperature comprese tra -30 °C e -15 °C in un congelatore a temperatura costante e lontano dalla luce.
- **Se conservato nel rispetto delle condizioni di stoccaggio raccomandate nella confezione originale, il kit è stabile per 15 mesi dalla data di produzione.**
- Evitare scongelamenti e congelamenti ripetuti. Non superare i 4 cicli di congelamento-scongelamento.
- Per garantire un'attività e prestazioni ottimali, le miscele di sonda e primer devono essere protette dalla luce per evitare il fotosbiancamento.
- Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo scorretto.

6. Avvertenze e precauzioni

Questo prodotto è solo per uso di ricerca. Non destinato a scopi od obiettivi medici.

7. Precauzioni generali

- Il test è destinato all'uso con DNA, ad esempio cfDNA estratto.
- Eliminare i campioni o i rifiuti secondo le procedure di sicurezza locali.
- I reagenti nel kit per le mutazioni di ESR1 di APIS sono stati diluiti in modo ottimale. Non diluire ulteriormente i reagenti.
- La miscela enzima 1 deve essere utilizzata con miscela sonda e primer da 1 a 4. La miscela enzima 2 deve essere utilizzata con miscela sonda e primer 5 e 6. Le miscele di enzimi 1 e 2 non sono intercambiabili a causa delle differenze nella concentrazione dei componenti e non devono essere utilizzate in modo errato.
- Prestare la massima attenzione nell'evitare di contaminare i componenti del kit con i reagenti del controllo positivo. Chiudere le provette subito dopo l'aggiunta di ciascun reagente.
- Prestare la massima attenzione nell'evitare la contaminazione crociata tra i campioni. Chiudere le provette subito dopo l'aggiunta di ciascun campione.
- Decontaminare accuratamente l'area di lavoro prima della configurazione.
- Non rimuovere il sigillo della piastra al termine dell'esecuzione.

8. Informazioni sulla sicurezza

- Quando si lavora con prodotti chimici, indossare sempre dispositivi di protezione individuale adeguati (camice da laboratorio, guanti monouso e occhialini di protezione). Per maggiori informazioni, consultare le schede di sicurezza (SDS).

9. Procedura


9.1 Configurazione piastra e ciclaggio

La master mix contiene tutti i componenti necessari per la qPCR, eccetto il DNA templato. Si raccomanda di includere i controlli forniti con il kit in ogni esecuzione (controllo negativo e controllo positivo). In un'esecuzione di qPCR possono essere analizzati fino a 8 campioni contemporaneamente.

Scongelare il DNA templato e tutti i componenti del kit (si consiglia di scongelare con ghiaccio o a 2-8 °C). È importante miscelare completamente le soluzioni prima dell'uso per evitare differenze di concentrazione localizzate.

9.1.1 Preparazione della master mix

Preparare un volume di master mix per una replica tecnica per campione di DNA, PC e NTC. Preparare sufficiente master mix per una ulteriore replica (n+1) per miscela per avere un volume di riserva sufficiente per l'allestimento della PCR.

 **Avvertenza:** nella preparazione di ciascuna master mix assicurarsi di combinare la miscela enzimatica e di sonda primer corrette.

La miscela enzima 1 deve essere utilizzata con miscela sonda e primer da 1 a 4. La miscela enzima 2 deve essere utilizzata con miscela sonda e primer 5 e 6.

Per ciascuna miscela di sonda primer, preparare le master mix in provette per microcentrifuga da 1,5 mL subito prima dell'uso, come indicato nella Tabella 2, regolando i volumi a seconda del numero di reazioni richiesto. Utilizzando un vortex/una centrifuga, miscelare le master mix per almeno 10 secondi e centrifugare per raccogliere il volume sul fondo della provetta.

Tabella 2: Produzione della master mix per il campione N=1.

ID della master mix	Provetta della miscela enzima	Volume di miscela enzima per reazione (µL)	Provetta miscela sonda primer	Volume della miscela sonda primer per reazione (µL)
Miscela 1	1	10	Miscela sonda primer 1	5
Miscela 2	1	10	Miscela sonda primer 2	5
Miscela 3	1	10	Miscela sonda primer 3	5
Miscela 4	1	10	Miscela sonda primer 4	5
Miscela 5	2	10	Miscela sonda primer 5	5
Miscela 6	2	10	Miscela sonda primer 6	5

9.1.2 Configurazione della reazione

- Si consiglia di posizionare la piastra/le provette per PCR su un blocco di raffreddamento.
- Pipettare in ogni pozzetto/provetta 15 µL di ogni master mix corrispondente e 5 µL di campione di DNA/controllo positivo o controllo negativo (Tabella 3). Nella Figura 1 è riportato un esempio di configurazione in una piastra per PCR da 96 pozzetti, con codifica di colore per ciascuna delle sei miscele, da 1 a 6.
- Per ridurre il rischio di contaminazione crociata, si consiglia di posizionare i controlli negativi e positivi lontano dai campioni di DNA o su un lato della piastra.
- La concentrazione finale di componenti per reazione è indicata nella Tabella 3.

Tabella 3: Concentrazione finale di componenti per reazione.

Componente	Volume/reazione (µL)	Concentrazione finale
Miscela enzima	10,0	1x
Miscela sonda primer	5,0	Variabile
Totale master mix	15	-
Campione (DNA templato/PC/NTC)	5,0	Variabile
Reazione totale Volume	20,0	-

- Sigillare la piastra usando uno strumento di guarnizione e sigillatura delle piastre per PCR.
- Miscelare nel vortex.
- Centrifugare per oltre 1 minuto per ruotare il contenuto sul fondo della piastra/delle provette.
- Valutare visivamente la presenza di bolle. Se presenti, agitare la piastra/le provette e centrifugare per altri 30 secondi. Ripetere fino a quando non sono più presenti bolle.
- Posizionare la piastra/le provette nello strumento compatibile per Real-Time PCR seguendo le istruzioni del produttore.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Mix 1 Sample 1	Mix 1 Sample 2	Mix 1 Sample 3	Mix 1 Sample 4	Mix 1 Sample 5	Mix 1 Sample 6	Mix 1 Sample 7	Mix 1 Sample 8		Mix 1 PC		Mix 1 NTC
B	Mix 2 Sample 1	Mix 2 Sample 2	Mix 2 Sample 3	Mix 2 Sample 4	Mix 2 Sample 5	Mix 2 Sample 6	Mix 2 Sample 7	Mix 2 Sample 8		Mix 2 PC		Mix 2 NTC
C	Mix 3 Sample 1	Mix 3 Sample 2	Mix 3 Sample 3	Mix 3 Sample 4	Mix 3 Sample 5	Mix 3 Sample 6	Mix 3 Sample 7	Mix 3 Sample 8		Mix 3 PC		Mix 3 NTC
D	Mix 4 Sample 1	Mix 4 Sample 2	Mix 4 Sample 3	Mix 4 Sample 4	Mix 4 Sample 5	Mix 4 Sample 6	Mix 4 Sample 7	Mix 4 Sample 8		Mix 4 PC		Mix 4 NTC
E	Mix 5 Sample 1	Mix 5 Sample 2	Mix 5 Sample 3	Mix 5 Sample 4	Mix 5 Sample 5	Mix 5 Sample 6	Mix 5 Sample 7	Mix 5 Sample 8		Mix 5 PC		Mix 5 NTC
F	Mix 6 Sample 1	Mix 6 Sample 2	Mix 6 Sample 3	Mix 6 Sample 4	Mix 6 Sample 5	Mix 6 Sample 6	Mix 6 Sample 7	Mix 6 Sample 8		Mix 6 PC		Mix 6 NTC
G												
H												

Figura 1: Miscele e disposizioni di campioni consigliate

9.2 Metodo di esecuzione

Nota: prima della configurazione verificare che lo strumento sia calibrato per i coloranti richiesti per questo esperimento.

Consultare il manuale d'istruzioni della piattaforma per real-time PCR selezionata per configurare l'esecuzione della PCR. I parametri di ciclaggio consigliati per la qPCR sono indicati nella Tabella 4.

Nota: il colorante di riferimento passivo non è incluso nel kit. Non selezionare la normalizzazione del colorante di riferimento passivo.

Tabella 4: Parametri di ciclaggio consigliati per il kit per le mutazioni di ESR1 di APIS.

Fase	Numero fase	Nome fase	Temp	Tempo	Velocità di rampa	Cicli
Hold Stage	1	Attivazione iniziale	95 °C	10 min	3,29 °C/s	1
PCR Stage	1	Denaturazione	94 °C	10 s	2,53 °C/s	40
	2	Annealing Estensione Acquisizione dati	60 °C	30 s	2,53 °C/s	

9.3 Impostazioni di soglia

Si raccomanda agli utenti di determinare empiricamente l'idoneità delle soglie per lo strumento qPCR in uso. La soglia deve essere impostata a livello di rilevamento o nel punto in cui una reazione raggiunge un'intensità di fluorescenza oltre ai livelli di fondo (in questo caso l'amplificazione WT). Si raccomanda agli utenti di impostare le soglie analizzando i campioni positivi e negativi per le mutazioni selezionate. Se si utilizza lo strumento Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 (QS5™) Dx, si raccomandano le soglie indicate nella Tabella 5.

Tabella 5: Acquisizione dati target e impostazioni di analisi per il kit per le mutazioni di ESR1 di APIS.

Miscela	Target	Colorante	Quencher	Soglia stimata ΔRn (QS5 Dx)*
Miscela 1	D538G	FAM™	BHQ-1®	50.000
	S463P	HEX™	BHQ-1®	36.000
Miscela 2	Y537S	FAM™	BHQ-1®	15.000
Miscela 3	Y537C	FAM™	BHQ-1®	26.500
Miscela 4	Y537N	FAM™	BHQ-1®	17.000
	L536X.1	HEX™	BHQ-1®	28.500
Miscela 5	E380Q	FAM™	BHQ-1®	20.000
	P535H	HEX™	BHQ-1®	6500
Miscela 6	L536X.2	FAM™	BHQ-1®	21.500
	Riferimento	HEX™	BHQ-1®	Auto

*Soglie da utilizzare solo con lo strumento QS5 Dx.

9.4 Analisi dell'esecuzione

Una volta terminata l'esecuzione, esportare i valori di Ct (in base allo strumento, questo dato può essere indicato anche come Cq o Cp). Consultare il manuale d'istruzioni della piattaforma per real-time PCR selezionata per le istruzioni di analisi ed esportazione.

9.4.1 Criteri di validità consigliati per l'esecuzione

L'esecuzione è considerata valida quando i risultati del controllo negativo per tutti i target non produce alcuna amplificazione e ogni target si amplifica nel controllo positivo. I criteri di validità consigliati per l'esecuzione per l'uso con lo strumento QS5 Dx sono indicati nella Tabella 6.

Tabella 6: Criteri di validità consigliati per il kit per le mutazioni di ESR1 di APIS.

Miscela	Target	Canale di rilevazione (Emissione max nm)	Negativo accettabile Intervallo Ct di controllo	Positivo accettabile Intervallo Ct di controllo
Miscela 1	D538G	6-FAM (520)	Indeterminato	$\geq 25,5 - \leq 31,4$
	S463P	HEX (555)	Indeterminato	$\geq 28,3 - \leq 34,0$
Miscela 2	Y537S	6-FAM (520)	Indeterminato	$\geq 21,9 - \leq 30,4$
Miscela 3	Y537C	6-FAM (520)	Indeterminato	$\geq 24,6 - \leq 32,9$
Miscela 4	Y537N	6-FAM (520)	Indeterminato	$\geq 25,0 - \leq 30,0$
	L536X.1	HEX (555)	Indeterminato	$\geq 28,6 - \leq 33,6$
Miscela 5	E380Q	6-FAM (520)	Indeterminato	$\geq 26,0 - \leq 32,2$
	P535H	HEX (555)	Indeterminato	$\geq 26,3 - \leq 31,3$
Miscela 6	L536X.2	6-FAM (520)	Indeterminato	$\geq 27,6 - \leq 32,6$
	Riferimento	HEX (555)	Indeterminato	$\geq 26,3 - \leq 31,3$

*Intervalli accettabili di controllo positivo per l'uso con lo strumento QS5 Dx. Si raccomanda agli utenti di altri strumenti di modificare le specifiche secondo quanto indicato.

9.4.2 Criteri di validità consigliati per il campione

Sono forniti i criteri di validità consigliati per il campione per l'uso con lo strumento QS5 Dx. La loro idoneità per altri strumenti per la PCR deve essere stabilita dall'utente ove necessario.

Si raccomanda che per ogni campione, il valore Ct del target di riferimento sia inferiore o uguale a un Ct pari a 34,5.

Se il target di riferimento è fuori specifica, il campione non è valido e deve essere ripetuto. Si raccomanda di ripetere l'estrazione con un volume maggiore di plasma per aumentare l'input del campione.

9.5 Interpretazione dei risultati

I valori Ct devono essere utilizzati per guidare lo stato di mutazione (positivo o negativo). I campioni in cui è riportato un valore Ct sono positivi per quella mutazione del target. Se non è indicato alcun Ct, lo stato di mutazione è negativo.

Se per L536X.1 o L536X.2 è indicato un valore Ct positivo, la mutazione di ESR1 presente nel campione è L536R, L536P, L536H o L536Q.

10. Caratteristiche di performance

10.1 Sensibilità analitica

10.1.1 Limite del bianco

Il limite del bianco (limit of blank, LoB) è stato stabilito analizzando campioni di cfDNA negativi derivati da linee cellulari e plasma umano sano, e campioni in bianco creati artificialmente con frammenti di DNA WT. Ogni campione è stato analizzato in due repliche, utilizzando due lotti di kit e uno strumento, in più giorni, per un totale di 144 repliche per target. Il disegno dello studio si è basato sulle linee guida EP17-A2 del CLSI. Per ciascun target, la percentuale complessiva di interpretazione corretta dei campioni è stata $\geq 98\%$. I risultati sono sintetizzati nella Tabella 7.

Tabella 7: Tassi di rilevamento calcolati per i campioni di cfDNA della linea cellulare, cfDNA del plasma umano e bianchi creati artificialmente con DNA WT nello studio del limite del bianco. Sono mostrate le soglie ΔRn applicate per questo studio.

Target	cfDNA linea cellulare (n=48)	cfDNA plasma umano (n=72)	Bianco* (n=24)	Soglia ΔRn
	Tasso di rilevamento	Tasso di rilevamento	Tasso di rilevamento	
D538G	0/48	0/72	0/24	50.000
S463P	0/48	0/72	0/24	36.000
Y537S	1/48	0/72	0/24	15.000
Y537C	0/48	0/72	0/24	26.500
Y537N	0/48	0/72	0/24	17.000
L536X.1	0/48	0/72	0/24	28.500
E380Q	0/48	2/72	0/24	20.000
P535H	0/48	1/72	0/24	6500
L536X.2	0/48	1/72	0/24	21.500

*Campione bianco creato artificialmente con 5000 copie di DNA WT.

10.1.2 Limite di rivelabilità

Per ciascun target è stato stabilito il Limite di rivelabilità (Limit of Detection, LoD) utilizzando campioni creati artificialmente con DNA WT e mutato a frequenza dell'allele mutante (MAF) variabile con un numero di copie complessivo di DNA pari a 5000 per reazione. Sono state generate 24 repliche per target, su due strumenti e due lotti di kit. Il disegno dello studio si è basato sulle linee guida EP17-A2 del CLSI. Il LoD è stato definito come la frequenza dell'allele mutante con identificazioni corrette $\geq 95\%$. Il LoD calcolato per ciascun target è indicato nella Tabella 8.

Tabella 8: LoD per il kit per le mutazioni di ESR1 di APIS in % di MAF e copie di DNA. Le copie di DNA mutato al LoD e le copie di DNA WT al LoD descrivono le copie di DNA di ciascun frammento nei campioni LoD prodotti artificialmente. Sono mostrate le soglie ΔRn applicate per questo studio.

Target	LoD (%MAF)	DNA mutato copie a LoD	DNA WT copie a LoD	ΔRn Soglia
D538G	0,40%	20	4980	50000
S463P	0,08%	4	4996	36000
Y537S	0,10%	5	4995	15000
Y537C	0,40%	20	4980	26500
Y537N	0,20%	10	4990	17000
L536X.1 (H)	0,80%	40	4960	28500
L536X.1 (Q)	0,80%	40	4960	28500
E380Q	1,00%	50	4950	20000
P535H	0,40%	20	4980	6500
L536X.2 (R)	0,70%	35	4965	21500
L536X.2 (P)	0,90%	45	4955	21500

10.2 Intervallo di misurazione

10.2.1 Intervallo lineare/dinamico

La linearità è stata determinata analizzando una serie di diluizioni di frammenti di DNA specifici per ciascuna mutazione. Ciascuna serie di diluizioni aveva otto livelli con tre repliche valutate a ciascun livello per stabilire la linearità nell'intervallo target da 5 a 10.000 copie di DNA. Nella Tabella 9 sono riportati l'intervallo dinamico, l'efficienza di reazione e i valori R2 per ciascun target.

Tabella 9: Intervallo lineare/dinamico per ciascun target nel kit per le mutazioni di ESR1 di APIS

Target	Pendenza	Efficienza (%)	R ₂	Intervallo dinamico (Copie di DNA)
D538G	-3,43	95,64	1,00	5-10.000
S463P	-3,26	102,49	0,99	5-10.000
Y537S	-3,64	88,22	0,99	5-10.000
Y537C	-3,33	99,67	1,00	5-10.000
Y537N	-3,34	99,10	0,99	5-10.000
L536X.1 (H)	-3,41	96,48	0,99	5-10.000
L536X.1 (Q)	-3,41	96,61	1,00	5-10.000
E380Q	-3,32	99,93	0,99	5-10.000
P535H	-3,35	98,69	1,00	5-10.000
L536X.2 (P)	-3,39	97,43	0,99	5-10.000
L536X.2 (R)	-3,35	98,92	1,00	5-10.000
Riferimento	-3,33	99,61	0,98	5-10.000

10.3 Specificità analitica e reattività crociata

L'analisi *in silico* è stata condotta con ThermoSleuth™ (software per DNA) per scansionare sequenze di oligonucleotidi rispetto a grandi database di genomi. ThermoSleuth™ ha valutato tutti i risultati termodinamicamente stabili per determinare eventuali siti di ibridazione errata e potenziali ampliconi off target. Tutti gli oligonucleotidi sono stati scansionati rispetto a database di sequenze per tutte le sequenze di RNA e DNA umano. Durante lo screening delle miscele multiplex con i database delle sequenze, non sono stati rilevati ampliconi non target potenzialmente problematici.

La reattività crociata e la specificità *in vitro* sono state stabilite valutando i frammenti di DNA specifici per ciascuna mutazione con tutte le miscele sonda primer. I frammenti sono stati preparati con 1000 copie di DNA e valutati in triplo. La reattività crociata è stata osservata solo tra le mutazioni situate nel codone L536 (Tabella 10), che sono riportate come L536X per qualsiasi risultato osservato (target marcati come L536X.1 e L536X.2 non differenziati).

Tabella 10: Specificità e reattività crociata osservata tra le mutazioni nel kit per le mutazioni di ESR1 di APIS. Verde indica la specificità e rosso indica la reattività crociata.

Target	Frammento di DNA										
	E380Q	S463P	P535H	L536H	L536P	L536R	L536Q	Y537N	Y537C	Y537S	D538G
E380Q	Verde										
S463P		Verde									
P535H			Verde								
L536H				Verde	Rosso	Rosso	Rosso				
L536P					Verde						
L536R				Rosso	Rosso	Verde					
L536Q				Rosso			Verde				
Y537N								Verde			
Y537C									Verde		
Y537S										Verde	
D538G											Verde















11. Risoluzione dei problemi

Per informazioni o per la risoluzione dei problemi, contattare il team tecnico di APIS Assay Technologies tramite il sito web (<https://www.apisassay.com/>)

12. Limitazioni

La reattività crociata si verifica tra le mutazioni sul codone L536. Possono essere individuate quattro mutazioni nel codone L536 (L536H, L536Q, L536R, L536P); non è tuttavia possibile un'identificazione individuale.

13. Simboli

Simbolo	Definizione	Simbolo	Definizione
	Codice lotto		Produttore
	Numero di catalogo		Controllo negativo
	Attenzione		Controllo positivo
	Consultare le istruzioni per l'uso o le istruzioni elettroniche per l'uso		Numero di serie
	Contenuto sufficiente per <24> test		Limite di temperatura
	Non utilizzare se la confezione è danneggiata e leggere le istruzioni per l'uso		Scadenza
	Tenere lontano dalla luce solare		Solo a scopo di ricerca

14. Informazioni di contatto



APIS Assay Technologies Ltd.
 Second Floor Citylabs 1.0, Nelson Street
 Manchester, M13 9NQ, Regno Unito
 +44 (0)161 9388179
technicalsupport@apisassay.com

Data di ultima revisione del documento:

07 MAGGIO 2024.

15. Informazioni per gli ordini

Visitare il sito APIS all'indirizzo <https://www.apisassay.com/>

Visitare il sito Biocartis all'indirizzo <http://www.biocartis.com/>