

Instructions for use

BCR-ABL Dx ELITe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real



REF RTSG07ING

UDI 08033891487485

CE **IVD**
0123

HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

Revisão	Aviso de alteração	Data (dd/mm/aaaa)
01	Desenvolvimento de novo produto	26/07/2024

TABLE OF CONTENT

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA	4
2 PRINCÍPIOS DO ENSAIO	4
3 DESCRIÇÃO DO PRODUTO	4
4 MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO	5
5 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	6
6 OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	6
7 AVISOS E PRECAUÇÕES	7
8 AMOSTRAS E CONTROLOS	8
9 PROCEDIMENTO do ELiTe InGenius	12
10 PROCEDIMENTO do ELiTe BeGenius	20
11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	26
12 REFERÊNCIAS	49
13 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	49
14 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	50
15 SÍMBOLOS	54
16 NOTIFICAÇÃO PARA OS UTILIZADORES	54
17 NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	55
Appendix A QUICK START GUIDE	56

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto **BCR-ABL Dx ELITE MGB® Kit** consiste num dispositivo médico de diagnóstico in vitro destinado a ser utilizado por profissionais de saúde como um ensaio qualitativo de transcrição reversa e PCR em tempo real de ácidos nucleicos multiplexados para a deteção de mARN da reordenação de *BCR::ABL* (BCR-ABL) e a discriminação das principais variantes extraídas de amostras clínicas.

O ensaio é capaz de detetar e identificar **p190 e1a2**, **p195 e6a2**, **p200 e8a2**, **p210 e13a2** e **e14a2** (análise de tipagem por fusão), **p230 e19a2** na primeira reação e **p190 e1a3**, **p195 e6a3**, **p200 e8a3**, **p210 e13a3** e **e14a3** (análise de tipagem por fusão), **p230 e19a3** na segunda reação.

O ensaio é validado em associação com os instrumentos **ELITE InGenius®** e **ELITE BeGenius®**, sistemas automatizado e integrado para a extração, transcrição reversa, PCR em tempo real e a interpretação dos resultados, usando amostras humanas de leucócitos do sangue periférico (PBL).

O produto destina-se a ser usado como um auxiliar no diagnóstico de leucemia positiva para BCR::ABL em pacientes com suspeita de terem leucemia associada à reordenação de BCR:ABL.

Os resultados devem ser interpretados em conjunto com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

2 PRINCÍPIOS DO ENSAIO

Este é um ensaio qualitativo de transcrição reversa e PCR em tempo real de um passo multiplexado para a deteção e a identificação dos principais mARN das isoformas BCR-ABL no ARN total isolado de amostras de PBL e, posteriormente, na retrotranscrição e amplificação em duas reações usando as misturas de reação completa **BCR-ABL a2** e **BCR-ABL a3** contendo primers e sondas com tecnologia ELITE MGB.

Table 1

mARN das isoformas BCR-ABL detetado		
	BCR-ABL a2 PCR Mix	BCR-ABL a3 PCR Mix
p190	e1a2	e1a3
p195	e6a2	e6a3
p200	e8a2	e8a3
p210 (análise de tipagem por fusão)	e13a2	e13a3
	e14a2	e14a3
p230	e19a2	e19a3

As sondas ELITE MGB são ativadas quando hibridizam com os correspondentes produtos da PCR. O **ELITE InGenius** e o **ELITE BeGenius** monitorizam o aumento da fluorescência e calculam os ciclos de limiar (Ct) e as temperaturas de fusão (Tm).

Nas sondas ELITE MGB, os fluoróforos são inativados no estado de cadeia única de espiral aleatória da sonda. Os fluoróforos são ativados no duplex amplicon / sonda dado que o inativador está espacialmente separado do fluoróforo. Ressalva-se que o fluoróforo não é clivado durante a PCR e pode ser utilizado para a análise da dissociação e o cálculo da temperatura de fusão.

3 DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto **BCR-ABL Dx ELITE MGB Kit** fornece os seguintes componentes:

- **BCR-ABL a2 PCR Mix**, uma mistura de PCR otimizada e estabilizada que contém primers e sondas específicos para:

- mARN de p190 e1a2, detetado no Canal **p190a2**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada pelo Eclipse Dark Quencher® e identificada com corante FAM,
- mARN de p195 e6a2, detetado no Canal **p195a2**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada por Eclipse Dark Quencher e identificada por corante AquaPhluor® 593 (AP593),
- mARN de p200 e8a2, detetado no Canal **p200a2**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada por Eclipse Dark Quencher e identificada por corante AquaPhluor 559 (AP559),
- mARN de p210 e13a2 e e14a2, detetados no Canal **p210a2**; as sondas são estabilizadas por MGB, inativadas por Eclipse Dark Quencher e identificadas com o corante AquaPhluor 639 (AP639),
- mARN de p230 e19a2, detetado no Canal **p230a2**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada por Eclipse Dark Quencher e identificada por corante AquaPhluor 690 (AP690),
- mARN de ABL, como um controlo interno endógeno, detetado no canal **ICa2**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada por Eclipse Dark Quencher e identificada por corante AquaPhluor 525 (AP525),

A **BCR-ABL a2 PCR Mix** também contém tampão, cloreto de magnésio, trifosfatos de nucleótido e polimerase de ADN de início a quente.

- **BCR-ABL a3 PCR Mix**, uma mistura de PCR otimizada e estabilizada que contém primers e sondas específicos para:
 - mARN de p190 e1a3, detetado no Canal **p190a3**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada pelo Eclipse Dark Quencher e identificada com corante FAM,
 - mARN de p195 e6a3, detetado no Canal **p195a3**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada por Eclipse Dark Quencher e identificada por corante AquaPhluor 593 (AP593),
 - mARN de p200 e8a3, detetado no Canal **p200a3**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada por Eclipse Dark Quencher e identificada por corante AquaPhluor 559 (AP559),
 - mARN de p210 e13a3 e e14a3, detetados no Canal **p210a3**; as sondas são estabilizadas por MGB, inativadas por Eclipse Dark Quencher e identificadas com o corante AquaPhluor 639 (AP639),
 - mARN de p230 e19a3, detetado no Canal **p230a3**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada por Eclipse Dark Quencher e identificada por corante AquaPhluor 690 (AP690), estabilizado por MGB e inativado por EDQ,
 - mARN de ABL, como um controlo interno endógeno, detetado no canal **ICa3**; a sonda é estabilizada por MGB, inativada por Eclipse Dark Quencher e identificada por corante AquaPhluor 525 (AP525).

A **BCR-ABL a3 PCR Mix** também contém tampão, cloreto de magnésio, trifosfatos de nucleótido e polimerase de ADN de início a quente.

- **RT EnzymeMix**, uma mistura otimizada e estabilizada de enzimas para a transcrição reversa.

O **BCR-ABL Dx ELITE MGB Kit** contém reagentes suficientes para **48 testes** no **ELITE InGenius** e no **ELITE BeGenius**, com 20 µL de GI-V PCR Mixes e 0,3 µL RT EnzymeMix usados por reação.

O **BCR-ABL Dx ELITE MGB Kit** pode também ser usado em associação com instrumentos equivalentes.

4 MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Table 2

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
BCR-ABL a2 PCR Mix ref. RTSG07INGA2	Mistura de reagentes para transcrição reversa e PCR em tempo real no tubo com tampa BRANCA	2 x 600 µL	-
BCR-ABL a3 PCR Mix ref. RTSG07INGA3	mistura de reagentes para transcrição reversa e PCR em tempo real no tubo com tampa AMARELA	2 x 600 µL	-
RT EnzymeMix ref. RTS003-RT	Enzimas de transcriptase reversa no tubo com tampa com inserção PRETA	2 x 20 µL	-

5 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Câmara de fluxo laminar.
- Luvas de nitrilo sem pó descartáveis ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrífuga de bancada (~5.000 RPM).
- Microcentrífuga de bancada (~13.000 RPM).
- Micropipetas e pontas estéreis com filtro de aerossol ou pontas de deslocação positiva estéreis (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Tubo de 50 mL com tampa roscada (Sarstedt, Alemanha, ref. 62.547.254).
- Tubo de 15 mL com tampa roscada (Sarstedt, Alemanha, ref. 62.554.502).
- Tubo com base de sustentação de 2,0 mL com tampa roscada (Sarstedt, ref. 72.694.005).
- Água de grau de biologia molecular.

6 OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

Os reagentes para extração da amostra, positive control e o negative control de amplificação e os consumíveis **não** são fornecidos com este produto.

Para a extração automática de ácidos nucleicos, transcrição reversa, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados das amostras, são necessários os produtos seguintes:

Table 3

Instrumentos e software	Produto e reagentes
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, ref. INT030). ELITe InGenius Software versão 1.3.0.19 (ou superior). BCR-ABL a2 ELITe_PC BCR-ABL a3 ELITe_PC Assay protocols (Protocolos de ensaio) com parâmetros para análise do Positive Control. BCR-ABL a2 ELITe_NC BCR-ABL a3 ELITe_NC Protocolos de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control. BCR-ABL a2 ELITe_PBL_200_100 BCR-ABL a3 ELITe_PBL_200_100 Protocolos de ensaio com parâmetros para análise de amostras de PBL.	ELITe InGenius SP RNA (EG SpA, ref. INT034SPRNA). ELITe InGenius DNase I (EG SpA, INT034DNASE). ELITe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, ref. INT032CS). Alternative Caps For Extraction Tubes (EG SpA, ref. 925-CAP) apenas com o ELITe InGenius (opcional). ELITe InGenius PCR Cassette (EG SpA, ref. INT035PCR). ELITe InGenius DNase tube adapter Kit (EG S.p.A. ref. G6431-000). ELITe InGenius Waste Box (EG SpA, ref. F2102-000). 300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., ref. TF-350-L-R-S) com o ELITe InGenius apenas. 1000 µL Filter Tips Tecan (Tecan, Switzerland, ref. 30180118) com o ELITe BeGenius apenas. BCR-ABL Dx - ELITe Positive Control (EG SpA, ref. CTRG07ING). Cell Lysis Solution (Promega, código A7933 ou reagente equivalente). RNA Lysis Buffer (Promega, código Z3051 ou reagente equivalente). Thioglycerol (Promega, código A208B-C ou reagente equivalente).
ELITe BeGenius (EG SpA, ref. INT040). ELITe BeGenius Software versão 2.2.1 (ou superior). BCR-ABL a2 ELITe_Be_PC BCR-ABL a3 ELITe_Be_PC Assay protocols (Protocolos de ensaio) com parâmetros para análise do Positive Control. BCR-ABL a2 ELITe_Be_NC BCR-ABL a3 ELITe_Be_NC Protocolos de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control. BCR-ABL a2 ELITe_Be_PBL_200_100 BCR-ABL a3 ELITe_Be_PBL_200_100 Protocolos de ensaio com parâmetros para análise de amostras de PBL.	

7 AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto foi concebido para utilização exclusiva in-vitro.

7.1 Avisos e precauções gerais

Manuseie e elimine todas as amostras biológicas como se fossem infecciosas. Evite o contacto direto com as amostras biológicas. Evite salpicos ou vaporizações. Tubos, pontas e outros materiais que entrarem em contacto com as amostras biológicas devem ser tratados durante, pelo menos, 30 minutos com hipoclorito de sódio (lixívia) a 3% ou em autoclave durante uma hora a 121 °C antes da eliminação.

Manuseie e elimine todos os reagentes e todos os materiais usados na realização do ensaio como se fossem infecciosos. Evite o contacto direto com os reagentes. Evite salpicos ou vaporizações. Os resíduos devem ser manuseados e eliminados em conformidade com as normas de segurança adequadas. Os materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Os resíduos líquidos que contenham ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação. Não permita que os reagentes de extração entrem em contacto com hipoclorito de sódio (lixívia).

Use vestuário e luvas de proteção adequados e proteja os olhos e o rosto.

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

Não coma, beba, fume ou aplique produtos cosméticos nas áreas de trabalho.

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

Elimine os reagentes remanescentes e os desperdícios em conformidade com os regulamentos em vigor.

Leia atentamente todas as instruções fornecidas antes de efetuar o ensaio.

Durante a realização do ensaio, siga as instruções fornecidas com o produto.

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

Use apenas os reagentes fornecidos com o produto e os recomendados pelo fabricante.

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

7.2 Avisos e precauções para biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular requerem profissionais qualificados e com formação, para evitar o risco de resultados incorretos, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos na amostra ou à contaminação da amostra por produtos da PCR.

Nunca transfira batas, luvas ou ferramentas de laboratório da área designada para a amplificação/deteção de produtos de amplificação para a área designada para a extração/preparação de reações de amplificação.

São necessárias batas de laboratório, luvas e ferramentas para preparação da sessão de trabalho.

As amostras devem ser adequadas e, se possível, exclusivas para este tipo de análise. As amostras devem ser manuseadas sob uma câmara de fluxo laminar. As pipetas usadas no manuseamento de amostras devem ser usadas exclusivamente para este fim específico. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, estar livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os reagentes devem ser manuseados sob uma câmara de fluxo laminar. As pipetas usadas no manuseamento dos reagentes devem ser usadas exclusivamente para este fim. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, estar livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os produtos de extração devem ser manuseados de modo a reduzir a dispersão para o ambiente, para evitar a possibilidade de contaminação.

As PCR Cassette devem ser manuseadas com cuidado de modo a evitar a emissão do produto da PCR para o ambiente e a contaminação da amostra e do reagente.

7.3 Avisos e precauções específicos para os componentes

Table 4

Componente	Temperatura de armazenamento	Utilização a partir da primeira abertura	Ciclos de congelação/descongelação
BCR-ABL a2 PCR Mix	-20°C ou inferior (protegido da luz)	um mês	até cinco
BCR-ABL a3 PCR Mix			
RT EnzymeMix	-20°C ou inferior	um mês	até dez vezes, durante até dez minutos a +2 / +8 °C

8 AMOSTRAS E CONTROLOS

8.1 Amostras

Este produto destina-se a ser usado no instrumento **ELITE InGenius** e no **ELITE BeGenius** com o ácido nucleico extraído das seguintes amostras clínicas identificadas e manuseadas de acordo com as diretrizes laboratoriais, e colhidas, transportadas e armazenadas sob as condições seguintes:

Table 5

Amostra	Requisitos de colheita	Condições de transporte/armazenamento
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)
Sangue periférico	colhido em EDTA ou em citrato de sódio	dentro de 24 horas e o mais tardar de 48 horas

NOTE

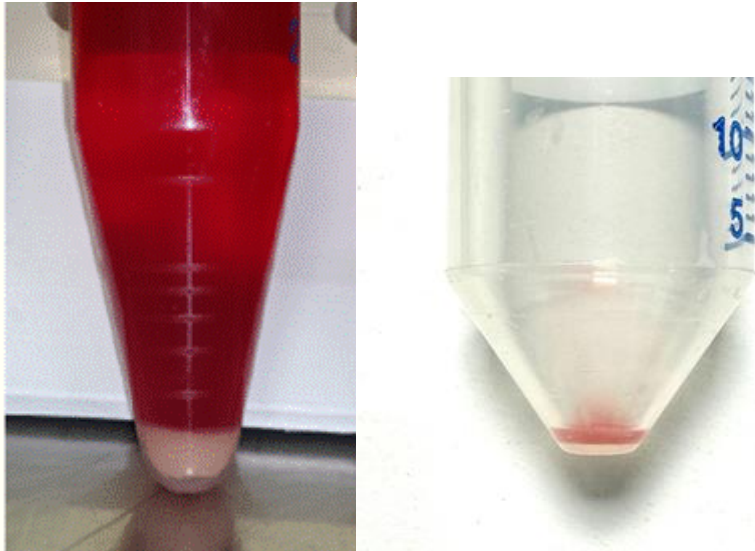
Não congele sangue periférico, para evitar a degradação do ARN.

Quando iniciar com sangue periférico, é obrigatório separar os leucócitos de acordo com as seguintes indicações.

Table 6

	A. Procedimento de pré-tratamento para o isolamento de leucócitos com creme leucocitário	A. Procedimento de pré-tratamento para o isolamento de leucócitos com Lise Direta
1	Prepare tubos de 15 mL e tubos de 2 mL necessários e identifique-os com um marcador de tinta permanente.	Prepare tubos de 50 mL e tubos de 2 mL necessários e identifique-os com um marcador de tinta permanente.
2	Não aplicável	Dispense Cell Lysis Solution (Promega, ref. A7933) para um tubo de 50 mL: use 15 mL se começar com 5 mL de sangue ou 30 mL se começar com 10 mL de sangue (relação 3:1).
3	Misture bem as amostras de sangue periférico colhidas em EDTA ou citrato de sódio por inversão.	
4	Transfira 5 - 10 mL de sangue periférico fresco para um tubo de 15 mL.	Transfira 5 - 10 mL de sangue periférico fresco para um tubo de 50 mL.
5	Centrifugue durante 10 minutos a 3.000 RCF (sem aplicação de pausa).	Não aplicável
6	Dispense 5 mL de Cell Lysis Solution (Promega, ref. A7933) para um novo tubo de 15 mL.	Não aplicável
7	Com uma pipeta de 1 mL, remova o creme leucocitário obtido após a centrifugação e transfira-o para o tubo de 15 mL contendo solução de lise celular. Lave a ponta na solução até não conter células.	Não aplicável
8	Incube à temperatura ambiente durante 10 minutos misturando por inversão (sem vórtice) pelo menos 3-4 vezes.	
9	Centrifugue durante 10 minutos a 3.000 RCF .	

Table 6 (continued)

	A. Procedimento de pré-tratamento para o isolamento de leucócitos com creme leucocitário	A. Procedimento de pré-tratamento para o isolamento de leucócitos com Lise Direta
10	NOTE A quantidade ideal de glóbulos brancos é representada, numa escala 1:1, na imagem seguinte  • Se o grânulo for igual ou inferior ao mostrado acima, remova o sobrenadante, ressuspensa o grânulo em 1,5 mL de Cell Lysis Solution e transfira-o para um tubo de 2,0 mL. • Se o grânulo for maior do que o mostrado acima, remova o sobrenadante, ressuspensa o grânulo em 3 mL de Cell Lysis Solution e transfira 1,5 mL para dois tubos diferentes de 2,0 mL.	
11	Centrifugue novamente durante cerca de 2 minutos a 3.000 RCF .	
12	Cuidadosamente, remova o sobrenadante (tenha o cuidado de remover os vestígios de leucócitos acima do grânulo de linfócitos).	
13	Lise cuidadosamente o grânulo em 200 µL de Homogenization Solution (1 mL de tampão de lise de ARN, Promega, ref. Z3051 + 20 µL de 1-tioglicerol, Promega, Ref. A208B-C) por pipetagem.	

O lisado de PBL pode ser imediatamente utilizado ou armazenado sob as condições seguintes:

Table 7

Tipo de amostra	Requisitos do tampão	Condições de armazenamento	
		-20 ± 10 °C	-70 ± 15 °C
Lisado de PBL	Solução de homogenização	≤ um mês	≤ um mês

Para realizar o teste de amostras no **ELiTe InGenius** e **ELiTe BeGenius**, devem ser usados os seguintes Protocolos de Ensaio. Estes protocolos de DIV foram especificamente validados com os **ELiTe InGenius** ou **ELiTe BeGenius** com as matrizes indicadas.

Table 8

Protocolos de ensaio para o BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit				
Amostra	Instrumento	Nome do protocolo de ensaio	Relatório	Características
PBL	ELITe InGenius	BCR-ABL a2 ELITe_PBL_200_100	Positiva / Negativa	Volume inicial de extração: 200 µL Volume de eluição do extraído: 100 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 10 µL
		BCR-ABL a3 ELITe_PBL_200_100		
	ELITe BeGenius	BCR-ABL a2 ELITe_Be_PBL_200_100		
		BCR-ABL a3 ELITe_Be_PBL_200_100		

Para todos os protocolos, têm de ser usados 200 µL de **amostra pré-tratada**:

- com o **ELITe InGenius**, transfira lisado de PBL de um tubo de 2,0 mL para um **Tubo de extração** (evite produzir bolhas durante a pipetagem),
- com **ELITe BeGenius**, o tubo de 2,0 mL contendo o lisado de PBL é diretamente usado

NOTE

Antes de carregar as amostras pré-tratadas nos instrumentos, centrifugue os conteúdos durante 5 segundos e mantenha-os em gelo ou no bloco de refrigeração. Quando é usado o **Extraction Tub** e (Tubo de extração), é recomendável usar também a tampa dedicada (EG SpA, ref. 925-CAP).

NOTE

A pipetagem de amostras para o **tubo de extração** pode **gerar contaminação**. Utilize as pipetas adequadas e siga todas as recomendações reportadas na secção "Advertências e precauções".

Os ácidos nucleicos purificados podem ser deixados à temperatura ambiente durante 16 horas e armazenados a -20 °C ou abaixo durante não mais de um mês.

Consulte "Substâncias Potencialmente Interferentes" na secção Características de Desempenho para verificar os dados relativos a substâncias interferentes.

8.2 Controlos da PCR

Os resultados do controlo da PCR têm de ser gerados e aprovados para cada lote de reagente de PCR.

- Para o Positive Control, utilize **BCR-ABL a2 Positive Control** e **BCR-ABL a3 Positive Control**, componentes do produto **BCR-ABL Dx - ELITe Positive Control** (não fornecido com este kit), com respetivamente os protocolos de ensaio **BCR-ABL a2 ELITe_PC** ou **BCR-ABL a2 ELITe_Be_PC** e **BCR-ABL a3 ELITe_PC** ou **BCR-ABL a3 ELITe_Be_PC**.
- Para o Negative Control, utilize água de qualidade para biologia molecular (não fornecida com este kit) com os protocolos de ensaio **BCR-ABL a2 ELITe_NC** ou **BCR-ABL a2 ELITe_Be_NC** e **BCR-ABL a3 ELITe_NC** ou **BCR-ABL a3 ELITe_Be_NC**.

NOTE

- O **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** permite a geração e o armazenamento da validação do controlo de PCR para cada lote de reagente de PCR. Os resultados do controlo da PCR expiram após **15 dias** e, nesse momento, é necessário voltar a executar os controlos positivos e negativos. Os Controlos da PCR devem ser novamente testados se ocorrer algum dos seguintes eventos:
- se for usado um novo lote de reagentes,
- Os resultados da análise de controlo da qualidade se encontrarem fora da especificação (ver o parágrafo seguinte),
- For realizada qualquer reparação ou manutenção significativa no **ELITe InGenius** ou **ELITe BeGenius**.

8.3 Controlos da qualidade

Recomenda-se a verificação do procedimento de extração e PCR. Podem ser usadas amostras arquivadas ou material de referência certificado. Os controlos externos devem ser usados em conformidade com as organizações de acreditação locais, estatais e federais, consoante aplicável.

9 PROCEDIMENTO do ELITe InGenius

O procedimento para usar o **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit** com o **ELITe InGenius** consiste em três passos:

Table 9

PASSO 1	Verificação da prontidão do sistema	
PASSO 2	Preparação da sessão	A) Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR])
		B) Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
		C) Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [apenas PCR])
PASSO 3	Revisão e aprovação de resultados	A) Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control
		B) Validação dos resultados da amostra
		C) Elaboração do relatório do resultado da amostra

9.1 PASSO 1 - Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

- ligar o **ELITe InGenius** e iniciar sessão no modo “CLOSED”,
- o menu “Controls” (Controlos) na página inicial, verifique se os controlos da PCR (**BCR-ABL a2 Positive Control**, **BCR-ABL a2 Negative Control**, **BCR-ABL a3 Positive Control**, **BCR-ABL a3 Negative Control**) foram aprovados e estão válidos (estado) para o lote de **PCR Mix** (**BCR-ABL a2 PCR Mix** e **BCR-ABL a3 PCR Mix**) a utilizar. Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote de **PCR Mix** execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,
- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA (consulte “Amostras e Controlos”).

Se o protocolo do ensaio que precisa não estiver carregado no sistema, contacte o Serviço de Apoio ao cliente da ELITechGroup de sua localidade.

9.2 PASSO 2 - Configuração da sessão

O **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit** pode ser usado no **ELITe InGenius** para realizar:

- A. Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR]),
- B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),
- C. Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [apenas PCR]).

Todos os parâmetros requeridos estão incluídos no Protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente carregados quando o Protocolo de ensaio é selecionado.

NOTE

Com o produto **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit**, na configuração A ou B, devem ser realizadas duas ações para cada amostra: uma com **BCR-ABL a2 PCR Mix** (para todas as isoformas BCR-ABL a2) e a outra com **BCR-ABL a3 PCR Mix** (para todas as isoformas BCR-ABL a3). Pode ser analisado um máximo de 6 amostras em cada sessão no **ELITe InGenius**.

NOTE

O **ELITE InGenius** pode ser ligado ao “Laboratory Information System” (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite descarregar a informação da sessão. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Antes de configurar uma execução:

1. Descongele os tubos de **BCR-ABL a2 PCR Mix** necessários (tampa BRANCA) e os tubos **BCR-ABL a3 PCR Mix** (tampa AMARELA) à temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para **24 testes** em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

Proteja a **PCR Mix** da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível.

2. Use os tubos **RT EnzymeMix** necessários. Cada tubo é suficiente para **48 testes**. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

A **RT EnzymeMix** não deve ser exposta a temperaturas superiores a -20 °C durante mais de 10 minutos.

3. Prepare um 2 mL tube (Sarstedt, ref. 72.694.005, não incluído no kit) para cada **mistura de reação completa** e identifique-o com um marcador de tinta permanente.
4. Calcule os volumes necessários de **BCR-ABL a2 PCR Mix**, **BCR-ABL a3 PCR Mix** e **RT EnzymeMix** para preparar as **misturas de reação completa** com base no número de amostras (N) a serem analisadas, conforme descrito na tabela seguinte.

Table 10

Número de amostras (N)	BCR-ABL a2 PCR Mix e BCR-ABL a3 PCR Mix	RT EnzymeMix
$1 \leq N \leq 5$	$(N + 1) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 1) \times 0,3 \mu\text{L}$
$6 \leq N \leq 11$	$(N + 2) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 2) \times 0,3 \mu\text{L}$
$N = 12$	290 μL	4,4 μL

5. Prepare as **misturas de reação completa** transferindo para o tubo de 2 mL identificado os volumes calculados dos dois componentes. Misture por meio de vórtice a baixa velocidade durante 10 segundos três vezes e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

As **misturas de reação completas** podem ser usadas dentro de 7 horas se mantidas refrigeradas (durante 2 sessões de 3,5 horas cada). A mistura de reação completa e **não pode** ser guardada para reutilização.

NOTE

As **misturas da reação completa** são sensíveis à luz, não exponha à luz direta.

6. Comece com lisados de PBL (**configuração A**), para cada amostra, realize uma execução integrada (modo “Extract + PCR” (Extrair + PCR), com **BCR-ABL a2 PCR Mix** e a execução da amplificação (modo “PCR Only” (Apenas PCR) com **BCR-ABL a3 PCR Mix**.
7. Comece com produtos de extração (**configuração B**), para cada amostra, realize duas execuções de amplificação (modo “PCR Only” (Apenas PCR) com **BCR-ABL a2 PCR Mix** e **BCR-ABL a3 PCR Mix**.

NOTE

É aconselhável criar um modelo no instrumento para facilitar a configuração da sessão (ver o manual ELITE InGenius).

Para configurar um dos três tipos de execução, siga os passos abaixo diante da GUI:

Table 11

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução de Controlo positivo e negativo (PCR Only [apenas PCR])
1	Identifique amostras pré-tratadas e, se necessário, descongele até à temperatura ambiente. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Para este ensaio, 200 µL da amostra devem ser transferidos para um Tubo de extração anteriormente identificado.	Descongele os Elution tubes contendo os ácidos nucleicos extraídos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.	Descongele os tubos de Positive Controls (a2 e a3) à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Cada tubo é suficiente para 4 reações.
2	Não aplicável	Não aplicável	Prepare os Negative Controls (a2 e a3) transferindo pelo menos 50 µL de água de grau de biologia molecular para um "Elution tube", fornecido com o ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).
4	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.
5	Para cada amostra, atribua um Track e introduza a "SampleID" (SID) digitando ou lendo o código de barras da amostra.	Para cada amostra, atribua um Track e introduza a "SampleID" (SID) digitando ou lendo o código de barras da amostra.	Não aplicável
6	Selecione o protocolo do ensaio na coluna "Assay" (Ensaio) (consulte "Specimens and Controls" (Amostras e controlos)): para cada amostra, atribua o protocolo de ensaio de a2 e o protocolo de ensaio de a3 na via uinte.	Selecione o protocolo do ensaio na coluna "Assay" (Ensaio) (consulte "Specimens and Controls" (Amostras e controlos)): para cada eluato, atribua o protocolo de ensaio de a2 e o protocolo de ensaio de a3 na via seguinte.	Selecione os protocolos do ensaio (a2 e a3, consulte "Specimens and Controls" (Amostras e controlos)) na coluna "Assay" (Ensaio). Introduza o número do lote e a data de validade do Positive Control e do Negative Control (água de grau biológico molecular).
7	Para o protocolo de ensaio a2 : certifique-se de que o "Protocol" (Protocolo) apresentado é "Extract + PCR" (Extrair + PCR) e selecione "Sample Position" (Posição da amostra) como "Extraction Tube" (Tubo de extração).	Para o protocolo de ensaio a2 : selecione "PCR Only" (Apenas PCR) na coluna "Protocol" (Protocolo) e a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" (Posição da amostra) como "Elution Tube (bottom row)" (Tubo de eluição [linha inferior]).	Certifique-se de que "PCR Only" (Apenas PCR) está selecionado na coluna "Protocol" (Protocolo).

Table 11 (continued)

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução de Controlo positivo e negativo (PCR Only [apenas PCR])
8	Para o protocolo de ensaio a3 : atribua o "Protocol" (Protocolo) "PCR Only" (apenas PCR) e selecione como "Sample Position" (Posição da amostra) a via da amostra.	Para o protocolo de ensaio a3 : selecione "PCR Only" (Apenas PCR) na coluna "Protocol" (Protocolo) e a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" (Posição da amostra) como a via do eluato.	Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" (Posição da amostra) é "Elution Tube (bottom row)" (Tubo de eluição [linha inferior]).
9	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
10	Carregue as misturas de reação completa no "Inventory Block" (Gestor do reagente) consultando a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote da mistura de PCR, data de validade e o número de reações para cada tubo.	Carregue as misturas de reação completa no "Inventory Block" (Gestor do reagente) consultando a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote da mistura de PCR, data de validade e o número de reações para cada tubo.	Carregue as misturas de reação completa no "Inventory Block" (Gestor do reagente) consultando a "Load List" (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote da mistura de PCR, data de validade e o número de reações para cada tubo.
11	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
12	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.
13	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
14	Carregue a PCR Cassette, os cartuchos de extração ELITE InGenius SP RNA, os tubos ELITE InGenius DNase I (sem tampa) e todos os consumíveis requeridos e amostras a serem extraídas	Carregue a PCR Cassette e o tubo de Eluição com as amostras extraídas	Carregue a PCR Cassette, e os tubos de Positive Control e Negative Control.
15	No ecrã da DNase I, insira "DNase I" como "Reagent Name" (Nome do reagente), número de lote e data de expiração.	Não aplicável	Não aplicável
16	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
17	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
18	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

NOTE

É aconselhável aguardar alguns minutos após o início da execução, para verificar a aspiração correta das amostras do tubo de extração. Ocasionalmente, o instrumento pode dar Erro 20081 (consulte a secção "Troubleshooting" (Resolução de problemas)).

Quando a sessão é concluída, o **ELITE InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

NOTE

No final da execução a restante amostra extraída no “**Elution tube**” (Tubo de eluição) deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 ± 10 °C durante não mais de um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

NOTE

As **misturas de reação completa** podem ser mantidas no bloco refrigerado durante até 7 horas (2 sessões de 3,5 horas cada). Misture suavemente e, em seguida, centrifugue os conteúdos durante 5 segundos antes do início da próxima sessão. A mistura de reação completa não pode ser guardada para reutilização.

NOTE

No final da execução o restante **Positive Control** deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C ou menos. Evite o derrame do Positive Control. O restante negative control deve ser eliminado.

NOTE

O **BCR-ABL a2 Positive Control** e o **BCR-ABL a3 Positive Control** podem ser utilizados durante 4 sessões separadas de 3,5 horas cada.

NOTE

No final da execução, a **PCR Cassette** e os outros consumíveis têm de ser eliminados seguindo todos os regulamentos governamentais e ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

9.3 PASSO 3 - Revisão e aprovação dos resultados

O **ELiTe InGenius** monitoriza os sinais de fluorescência do alvo e do controlo interno para cada reação e aplica automaticamente os parâmetros do Assay Protocol (Protocolo de ensaio) para gerar curvas de PCR que são então interpretadas sob a forma de resultados.

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã “Results Display” (Exibição dos resultados). Neste ecrã são apresentados os resultados e informações sobre a execução. A partir deste ecrã é possível aprovar os resultados, imprimir ou guardar os relatórios (“Sample Report” ou “Track Report”). Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

Quando é usado **BCR-ABL Dx ELiTe MGB Kit**, duas execuções de amplificação para cada amostra são realizadas usando **BCR-ABL a2 PCR Mix** (para isoformas BCR-ABL a2) e **BCR-ABL a3 PCR Mix** (para isoformas BCR-ABL a3). A análise do resultado deve ser executada por ambas as execuções.

NOTE

O sistema **ELiTe InGenius** pode ser ligado ao “Laboratory Information System” (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite carregar os resultados da sessão no centro de dados laboratoriais. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

O **ELiTe InGenius** gera os resultados utilizando o **BCR-ABL Dx ELiTe MGB Kit** através do seguinte procedimento:

- A. Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control,
- B. Validação dos resultados da amostra,
- C. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

9.3.1 A. Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação

O **ELITE InGenius software** interpreta os resultados da PCR para os alvos das reações de Positive Control e Negative Control com os parâmetros dos protocolos do ensaio **BCR-ABL a2 ELITE_PC**, **BCR-ABL a3 ELITE_PC**, **BCR-ABL a2 ELITE_NC** e **BCR-ABL a3 ELITE_NC**. Os valores de Ct e Tm resultantes são usados para verificar o sistema (lote de reagentes e instrumento).

Os resultados do Positive Control e Negative Control, específicos para o lote do reagente de PCR, são registados na base de dados (Controlos) e podem ser visualizados e aprovados pelos utilizadores "Administrator" (Administrador) ou "Analyst" (Analista) seguindo as instruções na GUI.

Os resultados do Positive Control e Negative Control expiram **após 15 dias**.

Os resultados da amplificação do Positive Control e Negative Control são usados pelo **ELITE InGenius software** do instrumento para preparar os Gráficos de controlo que monitorizam os desempenhos do passo de amplificação. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

Se o resultado do Positive Control e Negative Control não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "Failed" (Reprovado) no ecrã "Controls" (Controlos). Neste caso, os resultados não podem ser aprovados e as execuções de Positive Control e Negative Control têm de ser repetidas.

NOTE

Se o Positive Control e Negative Control forem inválidos e as amostras tiverem sido incluídas na mesma execução, as amostras podem ser aprovadas mas os resultados não são válidos. Neste caso, o Controlo(s) e amostras falhados têm todos de ser repetidos.

9.3.2 B. Validação dos resultados das amostras

O **ELITE InGenius software** interpreta os resultados da PCR para os alvos (Canais **p190a2**, **p195a2**, **p200a2**, **p210a2**, **p230a2**) e o Controlo Interno (Canal **ICa2**) com os parâmetros do protocolo de ensaio **BCR-ABL a2 ELITE_PBL_200_100** e os alvos (canais **p190a3**, **p195a3**, **p200a3**, **p210a3**, **p230a3**) e o controlo interno (canal **ICa3**) com os parâmetros do protocolo de ensaio **BCR-ABL a3 ELITE_PBL_200_100**.

Os resultados são mostrados no ecrã "Result Display".

Os resultados da amostra podem ser aprovados quando forem cumpridas as condições reportadas nas tabelas abaixo.

Table 12

Ensaio com a BCR-ABL a2 PCR Mix	
1) Positive Control	Estado
BCR-ABL a2 Positive Control	APROVADO
2) Negative Control	Estado
Controlo negativo BCR-ABL a2	APROVADO

Table 13

Ensaio com a BCR-ABL a3 PCR Mix	
1) Positive Control	Estado
BCR-ABL a3 Positive Control	APROVADO
2) Negative Control	Estado
Controlo negativo BCR-ABL a3	APROVADO

Os resultados da amostra são automaticamente interpretados pelo **software ELITE InGenius** usando os parâmetros do Assay Protocol (Protocolo do ensaio). Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado.

Para cada amostra o sistema comunica uma combinação das seguintes mensagens a especificar se os ARNs foram detetados ou não detetados.

Table 14

Ensaio com a BCR-ABL a2 PCR Mix	
Resultado da execução da amostra	Interpretação
ARN:p190a2 Detetado e1a2	Foi detetado mARN de p190 na amostra. A isoforma é e1a2 .
ARN:p190a2 Detetado Typing not determined	Foi determinado mARN de p190 mas a análise de Tm não é possível.
ARN:p190a2 Não detetado ou abaixo de LoD	Não foi detetado mARN de p190 na amostra. A amostra é negativa para mARN de p190 ou a sua concentração está abaixo do limite de deteção do ensaio.
ARN:p200a2 Detetado e8a2	Foi detetado mARN de p200 na amostra. A isoforma é e8a2 .
ARN:p200a2 Detetado Typing not determined	Foi determinado mARN de p200 mas a análise de Tm não é possível.
ARN:p200a2 Não detetado ou abaixo de LoD	Não foi detetado mARN de p200 na amostra. A amostra é negativa para mARN de p200 ou a sua concentração está abaixo do limite de deteção do ensaio.
ARN:p195a2 Detetado e6a2	Foi detetado mARN de p195 na amostra. A isoforma é e6a2 .
ARN:p195a2 Detetado Typing not determined	Foi determinado mARN de p195 mas a análise de Tm não é possível.
ARN:p195a2 Não detetado ou abaixo de LoD	Não foi detetado mARN de p195 na amostra. A amostra é negativa para mARN de p195 ou a sua concentração está abaixo do limite de deteção do ensaio.
ARN:p210a2 Detetado e13a2	Foi detetado mARN de p210 na amostra. A isoforma é e13a2 .
ARN:p210a2 Detetado e14a2	Foi detetado mARN de p210 na amostra. A isoforma é e14a2 .
ARN:p210a2 Detetado e13a2 e14a2	Foi detetado mARN de p210 na amostra. Ambas as isoformas, e13a2 e e14a2 , estão presentes.
ARN:p210a2 Detetado Typing not determined	Foi determinado mARN de p210 mas a análise de Tm não é possível.
ARN:p210a2 Não detetado ou abaixo de LoD	Não foi detetado mARN de p210 na amostra. A amostra é negativa para mARN de p210 ou a sua concentração está abaixo do limite de deteção do ensaio.
ARN:p230a2 Detetado e19a2	Foi detetado mARN de p230 na amostra. A isoforma é e19a2 .
ARN:p230a2 Detetado Typing not determined	Foi determinado mARN de p230 mas a análise de Tm não é possível.
ARN:p230a2 Não detetado ou abaixo de LoD	Não foi detetado mARN de p230 na amostra. A amostra é negativa para mARN de p230 ou a sua concentração está abaixo do limite de deteção do ensaio.
Inválido - Testar novamente a amostra.	Resultado do ensaio inválido causado pela falha do controlo interno. O teste deve ser repetido.

Table 15

Ensaio com a BCR-ABL a3 PCR Mix	
Resultado da execução da amostra	Interpretação
ARN:p190a3 Detetado e1a3	Foi detetado mARN de p190 na amostra. A isoforma é e1a3 .
ARN:p190a3 Detetado Typing not determined	Foi determinado mARN de p190 mas a análise de Tm não é possível.
ARN:p190a3 Não detetado ou abaixo de LoD	Não foi detetado mARN de p190 na amostra. A amostra é negativa para mARN de p190 ou a sua concentração está abaixo do limite de deteção do ensaio.
ARN:p200a3 Detetado e8a3	Foi detetado mARN de p200 na amostra. A isoforma é e8a3 .
ARN:p200a3 Detetado Typing not determined	Foi detetado ARN p200 mas a análise de Tm não é possível.
ARN:p200a3 Não detetado ou abaixo de LoD	Não foi detetado mARN de p200 na amostra. A amostra é negativa para mARN de p200 ou a sua concentração está abaixo do limite de deteção do ensaio.
ARN:p195a3 Detetado e6a3	Foi detetado mARN de p195 na amostra. A isoforma é e6a3 .
ARN:p195a3 Detetado Typing not determined	Foi determinado mARN de p195 mas a análise de Tm não é possível.
ARN:p195a3 Não detetado ou abaixo de LoD	Não foi detetado mARN de p195 na amostra. A amostra é negativa para mARN de p195 ou a sua concentração está abaixo do limite de deteção do ensaio.
ARN:p210a3 Detetado e13a3	Foi detetado mARN de p210 na amostra. A isoforma é e13a3 .
ARN:p210a3 Detetado e14a3	Foi detetado mARN de p210 na amostra. A isoforma é e14a3 .
ARN:p210a3 Detetado e13a3 e14a3	Foi detetado mARN de p210 na amostra. Ambas as isoformas, e13a3 e e14a3 , estão presentes.
ARN:p210a3 Detetado Typing not determined	Foi determinado mARN de p210 mas a análise de Tm não é possível.
ARN:p210a3 Não detetado ou abaixo de LoD	Não foi detetado mARN de p210 na amostra. A amostra é negativa para mARN de p210 ou a sua concentração está abaixo do limite de deteção do ensaio.
ARN:p230a3 Detetado e19a3	Foi detetado mARN de p230 na amostra. A isoforma é e19a3 .
ARN:p230a3 Detetado Typing not determined	Foi determinado mARN de p230 mas a análise de Tm não é possível.
ARN:p230a3 Não detetado ou abaixo de LoD	Não foi detetado mARN de p230 na amostra. A amostra é negativa para mARN de p230 ou a sua concentração está abaixo do limite de deteção do ensaio.
Inválido- Testar novamente a amostra.	Resultado do ensaio inválido causado pela falha do controlo interno. O teste deve ser repetido.

Amostras indicadas como “Invalid - Retest Sample” (Inválido - testar novamente amostra): caso, o ADN do Controlo Interno não foi detetado eficientemente devido a problemas nos passos de colheita, pré-tratamento, transcrição reversa, extração ou PCR da amostra (por ex. amostragem incorreta, degradação ou perda do ARN durante a extração ou inibidores na eluição), que pode causar resultados incorretos.

Se subsistir volume da eluição suficiente, o eluato pode ser novamente testado (tal como está ou diluído) através de uma execução da amplificação no modo “PCR Only” (Apenas PCR). Se o segundo resultado for inválido, a amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova amostra utilizando o modo “Extract + PCR” (modo “Troubleshooting” (Resolução de problemas)).

Amostras reportadas como “**pXXXXxx:RNA Detected Typing not determined**” (ARN:pXXXXxx detetado Tipagem indeterminada) não são adequadas para análise de fusão. Neste caso, foi detetada um Ct, mas o Tm não foi detetado ou foi detetado fora do intervalo estabelecido devido a problemas nos passos de colheita de amostras, pré-tratamento, extração, transcrição reversa ou PCR (por exemplo, amostragem incorreta, degradação ou perda de ARN durante a extração, transporte de inibidores no eluato ou alto ruído), o que pode causar resultados incorretos.

Se subsistir volume da eluição suficiente, sugere-se testar novamente a amostra (tal como está ou diluída) através de uma execução da amplificação no modo “PCR Only” (Apenas PCR). Se o segundo resultado for igual, a amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova amostra utilizando o modo “Extract + PCR” (modo “Troubleshooting” (Resolução de problemas)).

As amostras relatadas como “**pXXXXxx:RNA:Not detected or below the LoD**” (ARN:pXXXXxx: não detetado ou abaixo do LdD) são adequadas para análise mas não foi detetado ARN de BCR-ABL. Neste caso, a amostra pode ser negativa para ARN de BCR-ABL ou o ARN de BCR-ABL está presente numa concentração abaixo do limite de detecção do ensaio (ver “Características de desempenho”).

NOTE

Em caso de teste positivo com múltiplas isoformas, verifique o valor de Ct de cada variante. A co-expressão de isoformas adicionais de BCR-ABL só deve ser diagnosticada quando os seus valores de Ct são comparáveis com a principal isoforma detetada ao Ct mais baixo (ver N. P. C. Cross et al. 2023). Caso contrário, só a principal isoforma ao valor de Ct mais baixo deve ser relatada.

NOTE

Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados em combinação com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

Os resultados da execução da Amostra são guardados na base de dados e, se válidos, podem ser aprovados (Exibição dos resultados) pelos utilizadores “Administrator” (Administrador) ou “Analyst” (Analista), seguindo as instruções na GUI. A partir da janela “Result Display” (Exibição de resultados) é possível imprimir e guardar os resultados da execução da amostra como “Sample Report” (Relatório de amostra) e “Track Report” (Relatório de calha).

9.3.3 C. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

Os resultados da amostra são guardados na base de dados e os relatórios podem ser exportados como “Sample Report” (Relatório da amostra) e “Track Report” (Relatório da calha).

O “Sample Report” (Relatório da amostra) apresenta os detalhes dos resultados pela amostra selecionada (SID).

O “Track Report” (Relatório do track) apresenta os detalhes do resultado pelo Rastreio selecionado.

O “Sample Report” (Relatório da amostra) e o “Track Report” (Relatório da calha) podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado.

10 PROCEDIMENTO do ELITe BeGenius

O procedimento para uso do **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit** com o **ELITe BeGenius** é composto por três passos:

Table 16

PASSO 1	Verificação da prontidão do sistema	
PASSO 2	Preparação da sessão	A) Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR])
		B) Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR]),
		C) Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [apenas PCR]).

Table 16 (continued)

PASSO 3	Revisão e aprovação de resultados	A) Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control
		B) Validação dos resultados da amostra
		C) Elaboração do relatório do resultado da amostra

10.1 PASSO 1 - Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

- ligue o **ELITe BeGenius** e inicie sessão no modo “**CLOSED**” (fechado),
- o menu “Controls” (Controlos) na página inicial, verifique se os controlos da PCR (**BCR-ABL a2 Positive Control**, **BCR-ABL a2 Negative Control**, **BCR-ABL a3 Positive Control**, **BCR-ABL a3 Negative Control**) foram aprovados e estão válidos (estado) para o lote de **PCR Mix (BCR-ABL a2 PCR Mix e BCR-ABL a3 PCR Mix)** a utilizar. Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote de **PCR Mix** execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,
- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA (consulte “Amostras e Controlos”).

Se o protocolo do ensaio que precisa não estiver carregado no sistema, contacte o Serviço de Apoio ao cliente da ELITechGroup de sua localidade.

10.2 PASSO 2 - Configuração da sessão

O **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit** pode ser usado no **ELITe BeGenius** para realizar:

- Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR]),
- Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),
- Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [apenas PCR]).

Todos os parâmetros requeridos estão incluídos no protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente carregados quando o protocolo de ensaio é selecionado.

NOTE

Com o produto **BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit**, na configuração A ou B, devem ser realizadas duas PCR para cada amostra extraída: uma com **BCR-ABL a2 PCR Mix** (para todas as isoformas BCR-ABL a2) e a outra com **BCR-ABL a3 PCR Mix** (para todas as isoformas BCR-ABL a3). Pode ser analisado um máximo de 12 amostras em cada sessão no **ELITe BeGenius**.

NOTE

O **ELITe BeGenius** pode ser ligado ao “Laboratory Information System” (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite descarregar a informação da sessão. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Antes de configurar uma execução:

- Descongele os tubos de **BCR-ABL a2 PCR Mix** necessários (tampa BRANCA) e os tubos **BCR-ABL a3 PCR Mix** (tampa AMARELA) à temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para **24 testes** em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture por meio de vórtice a baixa velocidade durante 10 segundos três vezes e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

Proteja a **PCR Mix** da luz enquanto a aquece, dado que este reagente é fotossensível.

- Use os tubos **RT EnzymeMix** necessários. Cada tubo é suficiente para **48 testes**. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

A **RT EnzymeMix** não deve ser exposta a temperaturas superiores a -20 °C durante mais de 10 minutos.

3. Prepare um 2 mL tube (Sarstedt, ref. 72.694.005, não incluído no kit) para cada **mistura de reação completa** e identifique-o com um marcador de tinta permanente.
4. Calcule os volumes necessários de **BCR-ABL a2 PCR Mix**, **BCR-ABL a3 PCR Mix** e **RT EnzymeMix** para preparar a **mistura de reação completa** com base no número de amostras (N) a serem analisadas, conforme descrito na tabela seguinte.

Table 17

Número de amostras (N)	BCR-ABL a2 PCR Mix e BCR-ABL a3 PCR Mix	RT EnzymeMix
$1 \leq N \leq 5$	$(N + 1) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 1) \times 0,3 \mu\text{L}$
$6 \leq N \leq 11$	$(N + 2) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 2) \times 0,3 \mu\text{L}$
$N = 12$	290 μL	4,4 μL
$13 \leq N \leq 18$	$(N + 3) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 3) \times 0,3 \mu\text{L}$
$19 \leq N \leq 23$	$(N + 4) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 4) \times 0,3 \mu\text{L}$
$N = 24$	580 μL	8,7 μL

5. Prepare a **mistura de reação completa** transferindo para o tubo de 2 mL identificado os volumes calculados dos dois componentes. Misture por meio de vórtice a baixa velocidade durante 10 segundos três vezes e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

A **mistura de reação completa** pode ser usada dentro de **7 horas** se mantida refrigerada (durante 2 sessões de 3,5 horas cada). A mistura de reação completa **não pode** ser guardada para reutilização.

NOTE

A **mistura da reação completa** é sensível à luz, não a exponha à luz direta.

6. Comece com lisados de PBL (**configuração A**), para cada amostra, realize uma execução integrada (modo "Extract + PCR" (Extrair + PCR), com **BCR-ABL a2 PCR Mix** e a execução da amplificação (modo "PCR Only" (Apenas PCR) com **BCR-ABL a3 PCR Mix**.
7. Comece com produtos de extração (**configuração B**), para cada amostra, realize duas execuções de amplificação (modo "PCR Only" (Apenas PCR) com **BCR-ABL a2 PCR Mix** e **BCR-ABL a3 PCR Mix**.

NOTE

É aconselhável criar um modelo no instrumento para facilitar a configuração da sessão (ver o manual ELITE BeGenius).

Para configurar um dos três tipos de execução, siga os passos abaixo diante da GUI:

Table 18

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução de Controlo positivo e negativo (PCR Only [apenas PCR])
1	Identifique amostras pré-tratadas e, se necessário, descongele à temperatura ambiente, misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Para este ensaio, 200 µL da amostra devem estar contidos no tubo Sarstedt de 2 mL.	Descongele os Elution tubes contendo os ácidos nucleicos extraídos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.	Descongele os tubos de Positive Controls (a2 e a3) à temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para 4 reações. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.
2	Não aplicável	Não aplicável	Prepare os Negative Controls (a2 e a3) transferindo pelo menos 50 µL de água de grau de biologia molecular para um "Elution tube" (Tubo de eluição), fornecido com o ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
3	Selecione " Perform Run " (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).	Selecione " Perform Run " (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).	Selecione " Perform Run " (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial).
4	Retire os Suportes da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.	Retire os "Racks" de "Lane 1, 2 and 3" (L1, L2, L3) da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação	Retire os "Racks" de "Lane 1, 2 and 3" (L1, L2, L3) da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
5	Selecione o "Run mode": " Extract + PCR " (Extrair + PCR).	Selecione o "Run mode": " PCR Only ".	Selecione o "Run mode": " PCR Only ".
6	Carregue as amostras no "Sample Rack". Quando os tubos secundários "2 mL Tubes" forem carregados, use adaptadores azuis para o "Sample Rack" (Rack da amostra).	Carregue as amostras no "Elution Rack" Rack de eluição).	Carregue os tubos de Positive Control e Negative Control no "Elution Rack" (Rack de eluição).
7	Insira o "Sample Rack" na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 5" (L5). Insira a "Sample ID" (SID) para cada "Position" usada (se os tubos secundários estiverem carregados, sinalize o "2 mL Tube". Se os tubos secundários não possuírem código de barras, digite manualmente a "Sample ID").	Insira o "Elution Rack" na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 3" (L3). Para cada "Position", insira a "Sample ID", a "Sample matrix", o "Extraction kit" e o "Extracted eluate vol." (volume de eluato extraído).	Insira o "Elution Rack" na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 3" (L3). Se necessário, para cada "Position" (Posição) introduza o "Reagent name" (Nome do reagente) e o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).
8	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
9	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 200 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 100 µL.
10	Selecione o protocolo do ensaio na coluna "Assay" (Ensaio) (consulte "Specimens and Controls" (Amostras e controlos)): para cada amostra a extrair, atribua os protocolos de ensaio a2 (Extrair + PCR) and a3 (Apenas PCR).	Selecione o protocolo do ensaio na coluna "Assay" (Ensaio) (consulte "Specimens and Controls" (Amostras e controlos)): para cada eluato, atribua os protocolos de ensaio a2 e a3.	Selecione o protocolo do ensaio (a2 e a3, consulte "Specimens and Controls" (Amostras e controlos)) na coluna "Assay" (Ensaio).

Table 18 (continued)

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extract+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])	C. Execução de Controlo positivo e negativo (PCR Only [apenas PCR])
11	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
12	Coloque os "Elution tubes" no "Elution Rack" (os tubos de eluição podem ser etiquetados com código de barras para melhorar a capacidade de localização).	Não aplicável	Não aplicável
13	Insira o "Elution Rack" na "Cooler Unit" começando a partir da "Lane 3" (L3).	Não aplicável	Não aplicável
14	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Não aplicável	Não aplicável
15	Carregue a mistura de reação completa no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).	Carregue a mistura de reação completa no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).	Carregue a mistura de reação completa no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição).
16	Insira o "Reagent/Elution Rack" na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2) se estiver disponível, ou na "Lane 1" (L1). Para cada reagente de PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).	Insira o "Reagent/Elution Rack" na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2) se estiver disponível, ou na "Lane 1" (L1). Para cada reagente de PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).	Insira o "Reagent/Elution Rack" na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2) se estiver disponível, ou na "Lane 1" (L1). Para cada reagente de PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).
17	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
18	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Racks" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua "Tip Racks", se necessário.
19	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
20	Coloque o " PCR Rack " com a "PCR Cassette" na Inventory Area (área dos reagentes).	Coloque o " PCR Rack " com a "PCR Cassette" na Inventory Area (área dos reagentes).	Coloque o " PCR Rack " com a "PCR Cassette" na Inventory Area (área dos reagentes).
21	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
22	Carregue o " Extraction Rack " (suporte de extração) com os cartuchos de extração "ELITe InGenius SP RNA", os tubos "ELITe InGenius DNase I" (sem tampa) e os consumíveis de extração necessários.	Não aplicável	Não aplicável
23	No ecrã da DNase I, insira "DNase I" como "Reagent Name" (Nome do reagente), número de lote e data de expiração.	Não aplicável	Não aplicável
24	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
25	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

NOTE

É aconselhável aguardar alguns minutos após o início da execução, para verificar a aspiração correta das amostras do tubo de 2 mL. Ocasionalmente, o instrumento pode dar Erro 20081 (consulte a secção “Troubleshooting” (Resolução de problemas)).

Quando a sessão é concluída, o **ELiTe BeGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

NOTE

No final da execução a restante amostra extraída no **Elution tube** (Tubo de eluição) deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 ± 10 °C durante não mais de um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

NOTE

A **mistura de reação completa** pode ser mantida no bloco refrigerado até 7 horas (2 sessões de 3,5 horas cada). Misture suavemente e centrifugue os conteúdos durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte. A mistura de reação completa não pode ser guardada para reutilização.

NOTE

No final da execução o restante **Positive Control** deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C ou menos. Evite o derrame de Positive Controls. O restante negative control deve ser eliminado.

NOTE

O **BCR-ABL a2 Positive Control** e o **BCR-ABL a3 Positive Control** podem ser utilizados durante 4 sessões separadas de 3,5 horas cada

NOTE

No final da execução, a **PCR Cassette** e os outros consumíveis têm de ser eliminados seguindo todos os regulamentos governamentais e ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

10.3 PASSO 3 - Revisão e aprovação dos resultados

O **ELiTe BeGenius** monitoriza os sinais de fluorescência do alvo e do controlo interno para cada reação e aplica automaticamente os parâmetros do Assay Protocol (Protocolo de ensaio) para gerar curvas de PCR que são então interpretadas sob a forma de resultados.

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã “Results Display” (Exibição dos resultados). Neste ecrã são apresentados os resultados e informações sobre a execução. A partir deste ecrã é possível aprovar os resultados, imprimir ou guardar os relatórios (“Sample Report” ou “Track Report”). Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

Quando é usado **BCR-ABL Dx ELiTe MGB Kit**, duas execuções de amplificação para cada amostra são realizadas usando **BCR-ABL a2 PCR Mix** (para isoformas BCR-ABL a2) e **BCR-ABL a3 PCR Mix** (para isoformas BCR-ABL a3). A análise do resultado deve ser executada por ambas as execuções.

NOTE

O sistema **ELiTe BeGenius** pode ser ligado ao “Laboratory Information System” (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite carregar os resultados da sessão no centro de dados laboratoriais. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

O **ELiTe BeGenius** gera os resultados utilizando o **BCR-ABL Dx ELiTe MGB Kit** através do seguinte procedimento:

- A. Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control,
 B. Validação dos resultados da amostra,
 C. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

NOTE

Para mais informações, consulte o mesmo parágrafo do Procedimento do **ELITE InGenius**.

11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

11.1 Limite de detecção (LdD)

O limite de detecção (LdD) do ensaio foi determinado para BCR-ABL p210 e14a2 no instrumento ELITE BeGenius testando o material de referência de ARN negativo para BCR-ABL reforçado a uma baixa concentração com material de referência de ARN positivo para p210 e14a2 (Invivoscribe).

Foi executada a análise de regressão Probit nos resultados, e estimou-se como LdD a concentração correspondente a 95% de probabilidade de um resultado positivo. Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 19

Alvo	LdD		Limites de intervalo de 95% de confiança	
			Limite inferior	Limite superior
p210 e14a2	Diluição	0,0000259	0,0000148	0,0000694
	Diluição do log	-4,6	-4,8	-4,2

O mARN de p210 e14a2 em amostras reforçados à concentração do LOD foi então quantificado e resultou em 8 cópias/reação (p210% = 0,0066%). O valor LdD calculado foi verificado para os alvos através do teste de mARN negativo extraídos de amostras de PBL reforçadas com ADN dos plasmídeos p190 e1a2, p195 e6a2, p210 e13a2, p210 e14a2, p200 e8a2, p230 e19a2, p190 e1a3, p195 e6a3, p210 e13a3, p210 e14a3, p200 e8a3, p230 e19a3 (GenScript) à concentração declarada no ELITE BeGenius e ELITE InGenius. Quando necessário, a concentração do alvo foi aumentada. Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 20

BCR-ABL a2 PCR Mix	
Alvo	LdD (cópias/reação)
p190 e1a2	8
p195 e6a2	8
p200 e8a2	50
p210 e13a2	8
p210 e14a2	8
p230 e19a2	20
BCR-ABL a3 PCR Mix	
Alvo	LdD (cópias/reação)
p190 e1a3	8

Table 20 (continued)

BCR-ABL a2 PCR Mix	
p195 e6a3	20
p200 e8a3	50
p210 e13a3	8
p210 e14a3	20
p230 e19a3	50

Os valores do LdD relatados na tabela foram confirmados tanto no ELITE BeGenius como no ELITE InGenius.

11.2 Inclusividade: Eficácia de detecção em diferentes isoformas BCR-ABL

A Inclusividade do ensaio, como eficácia de detecção das principais isoformas de BCR-ABL, foi avaliada por análise in silico. A análise revelou um elevado nível de conservação da sequência e a ausência de mutações significativas. Por isso, é esperada uma amplificação e detecção eficazes de todas as isoformas de BCR-ABL.

A Inclusividade também foi verificada através da análise do material de referência de ARN negativo para BCR-ABL reforçado por ARN sintético (GenScript) para cada alvo a baixa concentração. Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 21

BCR-ABL a2 PCR Mix			
Alvo	Isoforma	Pos. / Rep.	Resultado
p190	e1a2	4 / 4	ARN:p190 detetado e1a2
p195	e6a2	4 / 4	ARN:p195 detetado e6a2
p200	e8a2	4 / 4	ARN:p200 detetado e8a2
p210	e13a2	4 / 4	ARN:p210 detetado e13a2
	e14a2	4 / 4	ARN:p210 detetado e14a2
p230	e19a2	8 / 8	ARN:p230 detetado e19a2
BCR-ABL a3 PCR Mix			
Alvo	Isoforma	Pos. / Rep.	Resultado
p190	e1a3	4 / 4	ARN:p190 detetado e1a3
p195	e6a3	4 / 4	ARN:p195 detetado e6a3
p200	e8a3	4 / 4	ARN:p200 detetado e8a3
p210	e13a3	4 / 4	ARN:p210 detetado e13a3
	e14a3	4 / 4	ARN:p210 detetado e14a3
p230	e19a3	8 / 8	ARN:p230 detetado e19a3

Todas as amostras foram corretamente pelo BCR-ABL Dx ELITE MGB Kit.

11.3 Interferência entre alvos

A interferência potencial entre os alvos do ensaio foi avaliada por um teste de co-amplificação no material de referência de ARN negativo para BCR-ABL reforçado por ADN de plasmídeos (GenScript) das isoformas mais frequentes.

Para cada alvo, a concentração mais baixa detetável em todas as réplicas é indicada na tabela seguinte.

Table 22

BCR-ABL a2 PCR Mix	
Alvo principal em 100.000 cópias/reação	Segundo alvo a baixa concentração
p190 e1a2	p210 e13a2, 100 cópias/reação
	p210 e14a2, 100 cópias/reação
p210 e13a2	p190 e1a2, 100 cópias/reação
	p210 e14a2, 10.000 cópias/reação
p210 e14a2	p190 e1a2, 100 cópias/reação
	p210 e13a2, 1.000 cópias/reação
BCR-ABL a3 PCR Mix	
Alvo principal em 100.000 cópias/reação	Segundo alvo a baixa concentração
p190 e1a3	p210 e13a3, 100 cópias/reação
	p210 e14a3, 100 cópias/reação
p210 e13a3	p190 e1a3, 100 cópias/reação
	p210 e14a3, 20.000 cópias/reação
p210 e14a3	p190 e1a3, 100 cópias/reação
	p210 e13a3, 5.000 cópias/reação

O BCR-ABL Dx Elite MGB Kit mostra uma interferência mínima em caso de co-expressão de duas das isoformas de BCR-ABL mais frequentes. Quando em canais diferentes, o segundo alvo pode ser detetado mesmo quando está presente cerca de 1000 vezes menos que o alvo principal.

11.4 Marcadores potencialmente interferentes: Reatividade cruzada

A potencial reatividade cruzada com outros marcadores que podem ser encontrados em amostras de sangue total foi avaliada para o ensaio através da análise *in silico*. A análise não demonstrou homologias significativas com outros marcadores (reordenações de genes humanos não pretendidas, vírus, bactérias, protozoários e fungos) e, por conseguinte, não se espera reatividade cruzada.

A ausência de reatividade cruzada com potenciais marcadores interferentes também foi verificada através da análise de um painel de marcadores não pretendidos (SIGMA-Aldrich, Invivoscribe, ATCC, ZeptoMetrix) reforçadas com material de referência de ARN negativo para BCR-ABL.

Os resultados relatados na tabela a seguir foram obtidos tanto com BCR-ABL a2 PCR Mix como com BCR-ABL a3 PCR Mix.

Table 23

Marcador	Positivo/réplicas						Resultado
	p190	p200	p195	p210	p230	p190	
ADN genómico humano	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
PML-RAR α	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
Inv(16)	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
EBV	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
CMV	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
HHV-6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
HHV-7	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
HHV-8	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
HIV-1	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada

Todos os marcadores potencialmente interferentes testados não apresentaram reatividade cruzada usando o BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit.

11.5 Marcadores potencialmente interferentes: Inibição

A potencial inibição causada por marcadores não pretendidos que podem ser encontrados em amostras de sangue total foi avaliada para o ensaio através da análise de um painel de marcadores não pretendidos (SIGMA-Aldrich, Invivoscribe, ATCC, ZepetoMetrix) reforçadas com ADN de plasmídeos (GenScript) de todos os alvos no material de referência de ARN negativo para BCR-ABL.

Os resultados relatados na tabela a seguir foram obtidos tanto com BCR-ABL a2 PCR Mix como com BCR-ABL a3 PCR Mix.

Table 24

Marcador	Positivo/réplicas						Resultado
	p190	p200	p195	p210 e13	p210 e14	p230	
hgDNA	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
PML-RAR α	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
Inv(16)	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
EBV	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
CMV	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
HHV-6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
HHV-7	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência

Table 24 (continued)

Marcador	Positivo/réplicas						Resultado
	p190	p200	p195	p210 e13	p210 e14	p230	
HHV-8	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
HIV-1	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência

Todos os marcadores potencialmente interferentes testados não apresentaram inibição para a amplificação do alvo usando o BCR-ABL Dx ELITE MGB Kit.

11.6 Substâncias potencialmente interferentes: Reatividade cruzada

A reatividade cruzada por substâncias potencialmente interferentes (endógenas e exógenas), que podem ser encontradas em amostras de sangue total foi avaliada para o ensaio através da análise de um painel de substâncias (Sigma-Aldrich) à concentração relevante reforçada em amostras simuladas negativas para BCR-ABL.

Os resultados relatados na tabela a seguir foram obtidos tanto com BCR-ABL a2 PCR Mix como com BCR-ABL a3 PCR Mix.

Table 25

Substância	Positivo/réplicas					Resultado
	p190	p200	p195	p210	p230	
Hemoglobina	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
Bilirrubina	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
Triglicéridos	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
EDTA	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
Heparina	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
Ganciclovir	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
Sulfato de abacavir	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
Cidofovir	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
Ribavirina	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
Amoxicilina + clavulanato	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
Cefpodoxime	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
Azitromicina	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada
Ciprofloxacina	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	Sem reatividade cruzada

O teste mostrou que todas as substâncias testadas não reagem de forma cruzada com os alvos usando o BCR-ABL Dx ELITE MGB Kit.

11.7 Substâncias potencialmente interferentes: Inibição

A potencial inibição de substâncias interferentes (endógenas e exógenas) que podem ser encontradas em amostras de sangue total foi avaliada para o ensaio através da análise de um painel de substâncias à concentração relevante com ADN de plasmídeos (GenScript) de todos os alvos em amostras simuladas negativas para BCR-ABL.

Os resultados relatados na tabela a seguir foram obtidos tanto com BCR-ABL a2 PCR Mix como com BCR-ABL a3 PCR Mix.

Table 26

Substância	Positivo/réplicas						Resultado
	p190	p200	p195	p210 e13	p210 e14	p230	
Hemoglobina	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
Bilirrubina	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
Triglicéridos	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
EDTA	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
Heparina	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
Ganciclovir	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
Sulfato de abacavir	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
Cidofovir	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
Ribavirina	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
Amoxicilina + clavulanato	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
Cefpodoxime	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
Azitromicina	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência
Ciprofloxacina	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	Sem interferência

O teste mostrou que as substâncias testadas não inibem a detecção de alvos usando o BCR-ABL Dx ELITE MGB Kit.

11.8 Contaminação cruzada

A possível contaminação cruzada durante a análise foi avaliada para o ensaio através do teste de 60 amostras simuladas negativas para BCR-ABL e 60 réplicas de amostras simuladas positivas para BCR-ABL reforçadas com ARN sintético p210 e14a2 (GenScript) à concentração de $\sim 1 \times 10^{10}$ cópias/mL em 5 sessões.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 27

Amostras	N	Positivo	Negativo	%Concordância
Positivo	60	60	0	100%
Negativo	60	0	60	100%

Neste teste com o BCR-ABL Dx ELITE MGB Kit, a contaminação cruzada não foi detetada dentro das sessões nem entre sessões.

11.9 Taxa de falha geral do sistema

Toda a taxa de falha do sistema para o ensaio foi avaliada através da análise de 50 amostras de PBL negativas para BCR-ABL, reforçadas com material de referência de ARN p190 e1a2 (Invivoscribe) a baixa concentração.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 28

Amostras	N	Positivo	Negativo	Taxa de falha geral do sistema
O PBL aumentou a baixa concentração	50	50	0	0%

Neste teste com o BCR-ABL Dx ELITE MGB Kit, todas as amostras de PBL foram positivas e a taxa de falha total do sistema foi igual a 0%.

11.10 Repetibilidade

A repetibilidade do ensaio foi avaliada no ELITE BeGenius e no ELITE InGenius através da análise de um painel de amostras simuladas negativas para BCR-ABL e amostras simuladas positivas para BCR-ABL com ARN sintéticos de BCR-ABL (GenScript) conforme se segue:

- NEG: amostra simulada, negativa.
- GRUPO A: amostra simulada, positiva para p190 e1a2, p210 e14a2, p190 e1a3, p210 e14a3.
- GRUPO B: amostra simulada, positiva para p195 e6a2, p210 e13a2, p195 e6a3, p210 e13a3.
- GRUPO C: amostra simulada, positiva para p200 e8a2, p230 e19a2, p200 e8a3, p230 e19a3.

Um exemplo dos resultados da Repetibilidade intra-sessão (em um dia) no ELITE BeGenius são mostrados na tabela seguinte.

Table 29

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P190 e1a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	29,19	0,38	1,31	69,2	0,23	0,33	100%
GRUPO B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		6	-	-	-	70,0	0,34	0,48	100%
GRUPO C		6	28,73	0,46	1,58	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		6	29,99	0,25	0,85	-	-	-	100%
GRUPO C		6	-	-	-	67,5	0,42	0,63	100%

Table 29 (continued)

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P210 e13a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	29,51	0,62	2,12	66,2	0,16	0,25	100%
GRUPO B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		6	32,11	0,44	1,38	56,5	0,18	0,31	100%
GRUPO C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		6	30,57	0,70	2,29	71,3	0,50	0,70	100%
BCR-ABL a3 PCR Mix									
NEG	P190 e1a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	29,83	0,14	0,46	64,0	0,08	0,12	100%
GRUPO B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		6	29,85	0,32	1,06	-	-	-	100%
GRUPO C		6	-	-	-	67,9	0,17	0,25	100%
NEG	P200 e8a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		6	-	-	-	67,5	0,30	0,44	100%
GRUPO C		6	28,41	0,27	0,95	-	-	-	100%
NEG	P210 e13a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	29,36	0,64	2,19	65,0	0,21	0,32	100%
GRUPO B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		6	-	-	-	-	-	-	100%

Table 29 (continued)

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P210 e14a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		6	29,81	0,53	1,79	57,0	0,20	0,35	100%
GRUPO C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		6	28,94	0,41	1,43	64,9	0,13	0,19	100%

Um exemplo dos resultados da repetibilidade intra-sessão (em um dia) no ELITE InGenius são mostrados na tabela seguinte.

Table 30

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P190 e1a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	28,30	0,37	1,31	69,8	0,08	0,12	100%
GRUPO B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		6	29,13	0,13	0,43	70,8	0,00	0,00	100%
GRUPO C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		6	28,16	0,26	0,92	68,1	0,11	0,16	100%
NEG	P210 e13a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	29,35	0,34	1,15	67,2	0,14	0,21	100%
GRUPO B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		6	-	-	-	-	-	-	100%

Table 30 (continued)

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P210 e14a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		6	31,74	0,26	0,81	57,8	0,41	0,71	100%
GRUPO C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a2	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		6	24,09	0,22	0,77	72,0	0,05	0,07	100%
BCR-ABL a3 PCR Mix									
NEG	P190 e1a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	28,58	0,53	1,85	64,5	0,06	0,10	100%
GRUPO B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		6	28,25	0,10	0,36	68,3	0,10	0,15	100%
GRUPO C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		6	27,07	0,23	0,86	68,3	0,16	0,24	100%
NEG	P210 e13a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	29,19	0,48	1,64	65,1	0,08	0,13	100%
GRUPO B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		6	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		6	29,33	0,18	0,60	57,6	0,04	0,07	100%
GRUPO C		6	-	-	-	-	-	-	100%

Table 30 (continued)

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P230 e19a3	6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		6	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		6	25,97	0,27	1,04	65,4	0,05	0,08	100%

Um exemplo dos resultados da repetibilidade inter-sessão (em dois dias) no ELITe BeGenius são mostrados na tabela seguinte.

Table 31

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P190 e1a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	29,38	0,47	1,81	69,2	0,19	0,27	100%
GRUPO B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		12	30,13	0,31	1,03	70,1	0,62	0,89	100%
GRUPO C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		12	28,89	0,39	1,36	67,7	0,37	0,55	100%
NEG	P210 e13a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	29,52	0,58	1,98	66,1	0,29	0,43	100%
GRUPO B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		12	32,23	0,37	1,16	56,9	0,63	1,10	100%
GRUPO C		12	-	-	-	-	-	-	100%

Table 31 (continued)

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P230 e19a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		12	30,44	0,53	1,74	71,5	0,44	0,62	100%
BCR-ABL a3 PCR Mix									
NEG	P190 e1a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	29,90	0,38	1,27	64,0	0,06	0,10	100%
GRUPO B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		12	29,57	0,43	1,44	67,8	0,39	0,58	100%
GRUPO C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		12	28,22	0,33	1,18	68,0	0,15	0,22	100%
NEG	P210 e13a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	29,27	0,65	2,22	65,0	0,20	0,31	100%
GRUPO B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		12	29,68	0,48	1,63	57,1	0,21	0,37	100%
GRUPO C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		12	28,53	0,55	1,92	65,0	0,15	0,23	100%

Um exemplo dos resultados da repetibilidade inter-sessão (em dois dias) no ELITe InGenius são mostrados na tabela seguinte.

Table 32

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P190 e1a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	28,29	0,43	1,51	69,8	0,07	0,11	100%
GRUPO B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		12	29,19	0,17	0,59	70,8	0,08	0,11	100%
GRUPO C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		12	27,86	0,47	1,69	68,2	0,12	0,18	100%
NEG	P210 e13a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	29,36	0,35	1,20	67,1	0,07	0,10	100%
GRUPO B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		12	31,78	0,25	0,78	58,5	0,11	0,19	100%
GRUPO C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a2	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		12	27,85	0,31	1,11	72,0	0,08	0,11	100%
BCR-ABL a3 PCR Mix									
NEG	P190 e1a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	28,56	0,48	1,68	64,5	0,06	0,09	100%
GRUPO B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		12	-	-	-	-	-	-	100%

Table 32 (continued)

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P195 e6a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		12	28,56	0,37	1,30	68,3	0,07	0,11	100%
GRUPO C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		12	26,78	0,36	1,34	68,3	0,14	0,21	100%
NEG	P210 e13a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	29,12	0,42	1,45	65,1	0,08	0,13	100%
GRUPO B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		12	29,64	0,38	1,28	57,5	0,05	0,09	100%
GRUPO C		12	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a3	12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		12	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		12	25,85	0,26	1,02	65,4	0,06	0,10	100%

No teste de repetibilidade, o BCR-ABL Dx ELITE MGB detetou todas as amostras conforme esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV igual a 3,19%.

11.11 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do ensaio foi avaliada no ELITE BeGenius e no ELITE InGenius através da análise de um painel de amostras simuladas de PBL negativas ou reforçadas com um painel de ARN sintético de BCR-ABL (GenScript) conforme descrito no teste anterior.

Os resultados da Reprodutibilidade entre lotes (em seis dias e três lotes) no Elite BeGenius são mostrados na tabela abaixo.

Table 33

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P190 e1a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	29,08	0,42	1,44	69,2	0,21	0,30	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	29,62	0,57	1,91	69,9	0,59	0,84	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	28,77	0,49	1,69	67,6	0,28	0,42	100%
NEG	P210 e13a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	29,25	0,50	1,72	66,1	0,70	1,06	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	31,99	0,49	1,52	56,7	0,44	0,78	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	29,67	0,76	2,55	71,4	0,36	0,51	100%
BCR-ABL a3 PCR Mix									
NEG	P190 e1a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	29,24	0,59	2,00	63,9	0,11	0,17	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%

Table 33 (continued)

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P195 e6a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	29,21	0,48	1,63	67,7	0,26	0,39	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	28,20	0,50	1,79	67,8	0,20	0,29	100%
NEG	P210 e13a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	28,85	0,66	2,29	65,0	0,19	0,29	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	29,66	1,07	3,61	57,1	0,17	0,29	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	28,02	0,70	2,51	64,8	0,31	0,47	100%

Os resultados da Reprodutibilidade entre lotes (em doze dias e três lotes) no Elite InGenius são mostrados na tabela abaixo.

Table 34

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P190 e1a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	27,85	0,53	1,91	69,7	0,09	0,13	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	28,73	0,41	1,42	70,8	0,07	0,10	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	27,58	0,49	1,77	68,2	0,12	0,18	100%
NEG	P210 e13a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	28,66	0,72	2,50	67,1	0,37	0,55	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	31,36	0,37	1,18	58,2	0,38	0,65	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	27,28	0,53	1,94	64,8	0,31	0,47	100%
BCR-ABL a3 PCR Mix									
NEG	P190 e1a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	27,99	0,65	2,32	64,4	0,12	0,19	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%

Table 34 (continued)

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P195 e6a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	28,22	0,40	1,43	68,4	0,08	0,12	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	26,76	0,47	1,74	68,3	0,15	0,21	100%
NEG	P210 e13a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	28,24	1,07	3,80	65,2	0,13	0,19	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	29,10	0,63	2,18	57,6	0,10	0,17	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	25,67	0,57	2,21	65,3	0,28	0,42	100%

Os resultados da Reprodutibilidade inter-instrumento (em seis dias, três lotes e três instrumentos) no Elite BeGenius são mostrados na tabela abaixo.

Table 35

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P190 e1a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	29,19	0,39	1,35	69,3	0,22	0,32	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	29,56	0,47	1,58	70,1	0,49	0,70	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	28,71	0,44	1,55	67,7	0,15	0,23	100%
NEG	P210 e13a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	29,09	0,46	1,58	66,2	0,69	1,04	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	31,80	0,46	1,44	56,7	0,58	1,02	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	29,03	0,43	1,50	71,5	0,21	0,30	100%
BCR-ABL a3 PCR Mix									
NEG	P190 e1a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	29,35	0,66	2,24	63,9	0,14	0,22	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%

Table 35 (continued)

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P195 e6a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	29,08	0,48	1,66	67,7	0,30	0,44	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	28,10	0,36	1,29	67,7	0,21	0,31	100%
NEG	P210 e13a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	28,36	1,25	4,42	64,9	0,23	0,35	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	26,69	1,05	3,54	57,1	0,20	0,36	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	27,65	0,60	2,18	64,8	0,31	0,48	100%

Os resultados da Reprodutibilidade Inter-instrumento (em doze dias, três lotes e três instrumentos) no Elite InGenius são mostrados na tabela abaixo.

Table 36

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P190 e1a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	28,02	0,39	1,40	69,8	0,13	0,19	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	28,85	0,50	1,75	70,8	0,28	0,39	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P195 e6a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	27,67	0,44	1,59	68,3	0,16	0,24	100%
NEG	P210 e13a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	28,71	0,29	1,01	67,1	0,11	0,17	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	31,52	0,41	1,30	58,1	0,40	0,68	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a2	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	27,20	0,49	1,80	72,0	0,12	0,17	100%
BCR-ABL a3 PCR Mix									
NEG	P190 e1a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	28,24	0,28	0,98	64,4	0,16	0,24	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%

Table 36 (continued)

Amostra	Alvo	N	Ct média	D. Ct % Coef.	Var. de Ct	Média Tm	D. padrão Tm % Coef.	Var. Tm	% Concordância
BCR-ABL a2 PCR Mix									
NEG	P195 e6a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	28,29	0,43	1,52	68,4	0,13	0,19	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P200 e8a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	26,79	0,50	1,86	68,3	0,25	0,36	100%
NEG	P210 e13a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	28,78	0,54	1,88	65,2	0,18	0,28	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P210 e14a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	29,32	0,54	1,85	57,6	0,08	0,14	100%
GRUPO C		36	-	-	-	-	-	-	100%
NEG	P230 e19a3	36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO A		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO B		36	-	-	-	-	-	-	100%
GRUPO C		36	25,65	0,69	2,68	65,3	0,30	0,46	100%

No teste de Reprodutibilidade, o BCR-ABL Dx ELITE MGB Kit detetou todas as amostras conforme esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV igual a 4,42%.

11.12 Especificidade do diagnóstico: Confirmação de amostras negativas

A Especificidade de Diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas negativas, foi avaliada em associação com o ELITE InGenius através da análise de amostras clínicas de PBL, certificadas negativas ou presumivelmente negativas para cada alvo.

Dado que o ELITE BeGenius tem desempenhos analíticos equivalentes ao ELITE InGenius, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a especificidade do diagnóstico do ensaio obtido em associação com o ELITE InGenius também se aplica ao ELITE BeGenius.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 37

Amostras de PBL negativas	N	Positivo	Negativo	% de especificidade do diagnóstico
p190	60	0	60	100%
p195	60	0	60	100%
p200	60	0	60	100%
p210	60	0	60	100%
p230	60	0	60	100%

Todas as amostras de PBL foram válidas e negativas para a análise.

O valor-limite da Ct de CI está definido para 31.

11.13 Sensibilidade de diagnóstico: Confirmação de amostras positivas

A Sensibilidade de Diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada em associação com o ELITE InGenius através da análise de amostras clínicas de PBL, positivas para cada alvo ou reforçadas com materiais de referência.

Dado que o ELITE BeGenius tem desempenhos analíticos equivalentes ao ELITE InGenius, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a sensibilidade do diagnóstico do ensaio obtido em associação com o ELITE InGenius também se aplica ao ELITE BeGenius.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Table 38

Amostras de PBL positivas ou reforçadas		N	Positivo	Negativo	% Sensibilidade de diagnóstico
p190	Positivas para e1a2	1	1	0	100%
	Reforçadas para e1a2	25	25	0	
	Reforçadas para e1a3	25	25	0	
p195	Reforçadas para e6a2	25	25	0	100%
	Reforçadas para e6a3	25	25	0	
p200	Positivas para e8a2	1	1	0	98%
	Reforçadas para e8a2	25	25	0	
	Reforçadas para e8a3	25	24	1	
p210	Positivas para e13a2	2	2	0	100%
	Reforçadas para e13a2	25	25	0	
	Reforçadas para e13a3	25	25	0	
	Positivas para e14a2	3	3	0	
	Reforçadas para e14a2	25	25	0	
	Reforçadas para e14a3	25	25	0	

Table 38 (continued)

Amostras de PBL positivas ou reforçadas		N	Positivo	Negativo	% Sensibilidade de diagnóstico
p230	Reforçadas para e19a2	25	25	0	100%
	Reforçadas para e19a3	25	25	0	

Uma amostra reforçada com p200 e8a2 apresentou resultado negativo discrepante.

NOTE

Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e o instrumento estão registados no Ficheiro técnico do produto “BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit”, FTP G07ING.

12 REFERÊNCIAS

- N. C. P. Cross et al. (2023) Leukemia 37: 2150 - 2167
M. Baccarani et al. (2019) Leukemia 33: 1173 - 1183.
J. Gabert et al. (2003) Leukemia. 17: 2318 – 2357
J. J. M. van Dongen et al. (1999) Leukemia. 13: 1901 – 1928
E. A. Lukhtanov et al. (2007) Nucleic Acids Res. 35: e30

13 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize este produto apenas com as seguintes amostras clínicas: leucócitos de amostras de sangue periférico colhidas em EDTA ou citrato de sódio.

Atualmente, não existem dados disponíveis relativos ao desempenho do produto com outras amostras clínicas.

Não use este produto com amostras de sangue total colhidas em heparina: a heparina inibe a transcrição reversa e a reação de PCR dos ácidos nucleicos e causa resultados inválidos.

Não use com este produto ARN extraído contendo uma elevada quantidade de ADN genómico humano que possa inibir a reação de transcrição reversa e a amplificação de ácidos nucleicos.

Os resultados obtidos com este produto dependem da identificação, colheita, transporte, armazenamento e processamento corretos das amostras. Para evitar resultados incorretos, é por isso necessário ter cuidado durante estes passos e seguir cuidadosamente as instruções de utilização fornecidas com o produto.

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de PCR em tempo real usado neste produto é sensível a contaminação a partir de amostras clínicas positivas, dos controlos positivos e dos produtos de PCR. A contaminação cruzada causa resultados falsos positivos. O formato do produto foi concebido para limitar a contaminação cruzada. No entanto, as contaminações cruzadas podem ser evitadas simplesmente através de boas práticas laboratoriais e do cumprimento destas instruções de utilização.

Este produto deve ser manuseado por pessoal qualificado e com formação no processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto requer o uso de equipamento de proteção individual que seja adequado para o processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto requer o uso de equipamento de proteção individual e instrumentos específicos para preparação da sessão de trabalho, para evitar falsos resultados positivos.

Para evitar resultados incorretos, este produto deve ser manuseado por profissionais qualificados e com formação em técnicas de biologia molecular, como extração, transcrição reversa, PCR e detecção de ácidos nucleicos.

É necessário ter áreas separadas para a preparação da mistura de reação completa e da extração/amplificação/detecção de produtos de amplificação para evitar falsos resultados positivos.

Devido a diferenças inerentes entre tecnologias, é recomendado que os utilizadores realizem estudos de correlação do método para calcular diferenças tecnológicas antes de mudar para uma nova tecnologia.

Um resultado negativo obtido com este produto indica que o ARN alvo não foi detetado no ARN extraído da amostra; no entanto, não pode negligenciar-se o facto de o ARN alvo ter um título mais baixo que o limite de detecção do produto (Ver Características de desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

No caso de co-expressão de uma ou mais isoformas, a sensibilidade de um alvo pode ser afetada pela amplificação de um segundo alvo (ver Características de desempenho).

Em caso de teste positivo com múltiplas isoformas, verifique o valor de Ct de cada variante. A co-expressão de isoformas adicionais de BCR-ABL só deve ser diagnosticada quando os seus valores de Ct são comparáveis com a principal isoforma detetada ao Ct mais baixo (ver N. P. C. Cross et al. 2023). Caso contrário, só a principal isoforma ao valor de Ct mais baixo deve ser relatada.

No caso da expressão de p210 e14a2 a título baixo, por vezes foi detetado um segundo Tm não específico, resultando numa dupla positividade de p210 e13a2 e p210 e14a2.

Os resultados obtidos com este produto podem, por vezes, ser inválidos devido a uma falha do controlo interno. Neste caso, a amostra deve ser novamente testada, começando pela extração, o que pode originar um atraso na obtenção dos resultados finais.

Possíveis polimorfismos, inserções ou eliminações na região do ARN alvo visada pelos primários do produto e as sondas podem prejudicar a detecção do ARN alvo.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, os resultados obtidos com este produto têm de ser interpretados em combinação com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, existe um risco residual de obter resultados inválidos, ou **resultados errados** com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou ainda mais reduzido. Nalguns casos, este risco residual pode contribuir para decisões erradas com potenciais efeitos perigosos para o doente. No entanto, este risco residual associado à utilização prevista do produto foi ponderado em relação aos potenciais benefícios para o paciente e foi considerado aceitável.

14 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Table 39

Reação de Positive Control inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da mistura de reação completa e do Positive Control. Verifique os volumes da mistura de reação completa e do Positive Control.
Erro na preparação da mistura de reação completa.	Verifique os volumes dos reagentes usados durante a preparação da mistura de reação completa.

Table 39 (continued)

Degradação da mistura de reação completa ou dos respetivos componentes.	Não utilize a mistura de reação completa durante mais de 2 sessões consecutivas (7 horas no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não deixe a mistura de reação completa à temperatura ambiente durante mais de 30 minutos. Não deixe a RT EnzymeMix a temperaturas superiores a -20 °C durante mais de 10 minutos. Prepare novamente a mistura de reação completa. Utilize uma nova alíquota de componentes.
Degradação do Positive Control.	Não use o Positive Control para mais de 4 sessões independentes (3,5 horas cada na área de extração ou na ou na Cooler Unit)). Utilize uma nova alíquota de Positive Control.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 40

Reação de Negative Control inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da mistura de reação completa e do Negative Control. Verifique os volumes da mistura de reação completa e do Negative Control.
Contaminação do Negative Control.	Não use o Negative Control para mais do que 1 sessão. Utilize uma nova alíquota de água de grau de biologia molecular.
Contaminação da mistura de reação completa ou dos respetivos componentes.	Prepare novamente a mistura de reação completa. Utilize uma nova alíquota de componentes.
Contaminação da área de extração, dos Racks, do Inventory Block (Gestor do reagente) ou da Cooler Unit	Limpe as superfícies com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos e as pontas utilizadas.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 41

Reação da amostra inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da mistura de reação completa e da amostra. Verifique os volumes da mistura de reação completa e da amostra.
Erro na preparação da mistura de reação completa.	Verifique os volumes dos reagentes usados durante a preparação da mistura de reação completa.
Degradação da mistura de reação completa ou dos seus componentes.	Não use a mistura de reação completa durante mais de 2 sessões consecutivas (7 horas na Inventory Area (área dos reagentes)). Não deixe a mistura de reação completa à temperatura ambiente durante mais de 30 minutos. Não deixe a RT EnzymeMix a temperaturas superiores a -20 °C durante mais de 10 minutos. Prepare novamente a mistura de reação completa. Utilize uma nova alíquota de componentes.

Table 41 (continued)

Reação da amostra inválida	
Causas possíveis	Soluções
Inibição devido a substâncias interferentes na amostra.	Repita a amplificação com uma diluição 1:2 em água de grau de biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR Only" (apenas PCR). Repita a extração com uma diluição de 1:2 da amostra pré-tratada em solução de homogeneização, numa sessão "Extract + PCR" (Extrair + PCR).
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 42

Curva de dissociação anómala	
Causas possíveis	Soluções
Ausência de um pico definido. Pico definido mas Tm diferente do de outras amostras e do Positive Control.	Verifique a presença de Ct do alvo inferior a 30. A elevada quantidade de produto de amplificação no final da reação pode interferir com a análise da curva de fusão. Repita a amplificação da amostra para confirmar a presença do alvo com uma possível mutação. O alvo da amostra deve ser sequenciado para confirmar a mutação.

Table 43

Erro no cálculo de Ct	
Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra ou amostra com sinal de fluorescência anómalo.	Se for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR, selecione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado como sendo positivo. Se não for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR, selecione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado como sendo negativo, ou deixe-o como inválido. Se for necessário um valor de Ct: - repita a amplificação de amostra eluída com uma diluição 1:10 em água de grau de biologia molecular numa sessão "PCR Only" (apenas PCR). - repita a extração com uma diluição de 1:2 da amostra pré-tratada em solução de homogeneização, numa sessão "Extract + PCR" (Extrair + PCR).

Table 44

Erro 20081 (é possível que não exista líquido no tubo de sonicação/extração).	
Causas possíveis	Soluções
Bolhas ou alta viscosidade da amostra.	- Verifique a amostra no tubo de extração para as vias necessárias. Se não houver amostra, coloque a amostra no tubo de extração para a via necessária. Se a amostra estiver presente, clique no botão "OK" na janela de diálogo para prosseguir com a extração. - Se o tempo se esgotar sem ação, a execução é interrompida. Neste caso, se a amostra estiver presente e a sessão puder ser reiniciada imediatamente após ter sido interrompida, a amostra poderá ser usada para a nova execução. Em alternativa, repita a extração com uma nova alíquota da amostra pré-tratada.

Table 45

Elevada taxa anómala de resultados positivos na mesma sessão (reações com valores de Ct recentes semelhantes)	
Causas possíveis	Soluções
Contaminação entre amostras durante os passos pré-analíticos.	Limpe a micropipeta com uma solução de hipoclorito de sódio (lixívia) a 3% nova ou detergente de ADN/ARN após usar a pipeta em cada amostra. Não use pipetas Pasteur. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. Introduza as amostras nas últimas posições dos instrumentos, tal como indicado nas GUI. Siga a sequência de carregamento indicada pelo software.
Contaminação pelo ambiente laboratorial.	Limpe todas as superfícies em contacto com o operador e as amostras (incluindo as pipetas) com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% (lixívia) nova ou produto de limpeza de ADN/ARN. Realize um ciclo de descontaminação U.V. Prepare novamente a mistura de reação completa.

15 SÍMBOLOS



Número de catálogo.



Limite máximo da temperatura.



Código de lote.



Prazo de validade (último dia do mês).



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*.



Cumprimento dos requisitos dos Regulamentos IVDR 2017/746/CE relativo a dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*. Certificação emitida pela TÜV Süd Product Service GmbH, Alemanha.



Identificação única do dispositivo



Contém suficiente para "N" testes.



Atenção, consulte as instruções de utilização.



Conteúdo.



Manter afastado da luz solar.



Fabricante.

16 NOTIFICAÇÃO PARA OS UTILIZADORES

Qualquer incidente grave ocorrido relacionado com o dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e às autoridades competentes do Estado-Membro em que o utilizador e/ou o doente se encontram localizados. No momento da revisão atual das IDU, não ocorreu nenhum incidente grave ou recolha de segurança com impacto no desempenho do produto e na segurança do dispositivo.

Um "Resumo da segurança e desempenho" será disponibilizado ao público através da base de dados europeia para dispositivos médicos (Eudamed) quando este sistema informático estiver operacional. Antes da notificação de total funcionalidade da Eudamed ter sido publicada, o "Resumo da Segurança e Desempenho" foi disponibilizado ao público mediante pedido por e-mail para emd.support@elitechgroup.com, em tempo útil.

17 NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

Este produto contém reagentes produzidos pela Thermo Fisher Scientific e são vendidos ao abrigo de contratos de licenciamento celebrados entre a ELITechGroup S.p.A. e respetivas sucursais e a Thermo Fisher Scientific. O preço de compra deste produto inclui direitos exclusivos, não transmissíveis, de utilização apenas desta quantidade do produto exclusivamente para atividades do comprador que estejam diretamente relacionadas com diagnósticos em humanos. Para obter mais informações sobre a aquisição de uma licença deste produto para outros fins que não os acima indicados, contacte o Licensing Department, Thermo Fisher Scientific. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

Os reagentes de deteção ELITE MGB® são abrangidos por um ou mais dos números de patente dos EUA 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 e números de patente EP 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 bem como candidaturas que estejam atualmente pendentes.

As tecnologias ELITE InGenius® e ELITE BeGenius® estão cobertas por patentes e candidaturas pendentes.

Esta licença limitada permite à pessoa ou entidade legal à qual este produto foi fornecido, usar o produto e os dados gerados pela utilização do produto, unicamente para diagnóstico humano. Nem o ELITechGroup S.p.A. nem os respetivos licenciantes concedem quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, para quaisquer outros fins.

Appendix A BCR-ABL Dx ELITE MGB Kit usado em associação com as plataformas Genius series®



CAUTION

Este documento é uma versão simplificada das instruções de utilização oficiais. Este documento está disponível apenas em inglês. Consulte o documento completo antes da utilização em www.elitechgroup.com

Utilização prevista

O produto **BCR-ABL Dx ELITE MGB® Kit** consiste num dispositivo médico de diagnóstico in vitro destinado a ser utilizado por profissionais de saúde como um ensaio qualitativo de transcrição reversa e PCR em tempo real de ácidos nucleicos multiplexados para a deteção de mRNA da reordenação de *BCR::ABL* (BCR-ABL) e a discriminação das principais variantes extraídas de amostras clínicas.

O ensaio é capaz de detetar e identificar **p190 e1a2**, **p195 e6a2**, **p200 e8a2**, **p210 e13a2** e **e14a2** (análise de tipagem por fusão), **p230 e19a2** na primeira reação e **p190 e1a3**, **p195 e6a3**, **p200 e8a3**, **p210 e13a3** e **e14a3** (análise de tipagem por fusão), **p230 e19a3** na segunda reação.

O ensaio é validado em associação com os instrumentos **ELITE InGenius®** e **ELITE BeGenius®**, sistemas automatizado e integrado para a extração, transcrição reversa, PCR em tempo real e a interpretação dos resultados, usando amostras humanas de leucócitos do sangue periférico (PBL).

O produto destina-se a ser usado como um auxiliar no diagnóstico de leucemia positiva para *BCR::ABL* em pacientes com suspeita de terem leucemia associada à reordenação de *BCR:ABL*.

Os resultados devem ser interpretados em conjunto com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

Sequência amplificada

BCR-ABL a2 PCR Mix			
Sequência	Gene	Fluoróforo	Canal
Alvo 1	p190 e1a2	FAM	p190a2
Alvo 2	P210, e13a2, A1692C, e14a2	AP639	P210a2
Alvo 3	P230 e19a2	AP690	P230a2
Alvo 4	P200 e8a2	AP559	p200a2
Alvo 5	p195 e6a2	AP593	p195a2
Controlo Interno	ABL	AP525	ICa2
BCR-ABL a3 PCR Mix			
Sequência	Gene	Fluoróforo	Canal
Alvo 1	p190 e1a3	FAM	p190a3
Alvo 2	p210, e13a3, A1692C, e14a3	AP639	P210a3
Alvo 3	p230 e19a3	AP690	P230a3
Alvo 4	P200 e8a3	AP559	p200a3
Alvo 5	p195 e6a3	AP593	p195a3
Controlo Interno	ABL	AP525	ICa3

Matriz validada

Sangue periférico colhido em EDTA ou citrato de sódio, pré-tratado para isolar os leucócitos no sangue periférico (PBL).

Conteúdo do Kit e produtos relacionados

BCR-ABL Dx ELITe MGB Kit (RTSG07ING)			BCR-ABL Dx - ELITe Positive Control (CTRG07ING)	
 x 2	 x 2	 x 2	 x 3	 x 3
BCR-ABL a2 PCR Mix 2 tubos de 600 µL 24 reações por tubo 48 reações por kit 5 ciclos de congelamento-descongelamento por tubo	BCR-ABL a3 PCR Mix 2 tubos de 600 µL 24 reações por tubo 48 reações por kit 5 ciclos de congelamento-descongelamento por tubo	RT EnzymeMix 2 tubos de 20 µL 48 reações por tubo 96 reações por kit 10 ciclos de congelamento-descongelamento	BCR-ABL a2 Positive Control 3 tubos de 160 µL 4 reações por tubo 12 reações por kit 4 ciclos de congelamento-descongelamento	BCR-ABL a3 Positive Control 3 tubos de 160 µL 4 reações por tubo 12 reações por kit 4 ciclos de congelamento-descongelamento
Prazo de conservação máximo:	18 meses		Prazo de conservação máximo:	24 meses
Temperatura de armazenamento	≤ -20°C		Temperatura de armazenamento	≤ -20°C

Outros produtos necessários não fornecidos no kit

› Instrumento ELITe InGenius: INT030. › Instrumento ELITe BeGenius: INT040. › ELITe InGenius SP RNA: INT034SPRNA. › ELITe InGenius® DNase I: INT034DNASE. › Conjunto de consumíveis ELITe InGenius SP200: INT032CS. › ELITe InGenius PCR Cassette: INT035PCR. › ELITe InGenius Waste Box: F2102-000.	› ELITe InGenius DNase tube adapter kit: G6431-000. › Pontas de filtro Axigen de 300 µL: TF-350-L-R-S. › Pontas de filtro Tecan de 1000 µL: 30180118. › Alternative Caps For Extraction Tubes (EG SpA, ref. 925-CAP) apenas com o ELITe InGenius (opcional). 925-CAP (opcional). › Cell Lysis Solution (Promega, código A7933 ou reagente equivalente). › RNA Lysis Buffer (Promega, código Z3051 ou reagente equivalente). › Thioglycerol (Promega, código A208B-C ou reagente equivalente).
--	---

Protocolo ELITe InGenius e ELITe BeGenius

› Volume da amostra › Volume de eluição total	200 µL 100 µL	› Volume de entrada de PCR eluato › Volume de PCR Mix › Frequência dos controles	10 µL 20 µL 15 dias
--	------------------	--	---------------------------

Desempenhos ELITE InGenius e ELITE BeGenius

Matriz	Alvo		Limite de detecção	Sensibilidade	Especificidade
Sangue periférico colhido em EDTA ou citrato de sódio	p190	e1a2	8 cópias/reação	100% (26 / 26)	100% (60 / 60)
		e1a3	8 cópias/reação	100% (25 / 25)	100% (60 / 60)
	p195	e6a2	8 cópias/reação	100% (25 / 25)	100% (60 / 60)
		e6a3	20 cópias/reação	100% (25 / 25)	100% (60 / 60)
	p200	e8a2	50 cópias/reação	100% (26 / 26)	100% (60 / 60)
		e8a3	50 cópias/reação	98% (24 / 25)	100% (60 / 60)
	p210	e13a2	8 cópias/reação	100% (27 / 27)	100% (60 / 60)
		e13a3	8 cópias/reação	100% (25 / 25)	100% (60 / 60)
		e14a2	8 cópias/reação	100% (28 / 28)	100% (60 / 60)
		e14a3	20 cópias/reação	100% (25 / 25)	100% (60 / 60)
	p230	e19a2	20 cópias/reação	100% (25 / 25)	100% (60 / 60)
		e19a3	50 cópias/reação	100% (25 / 25)	100% (60 / 60)

Preparação da amostra

Este produto destina-se a ser usado no instrumento **ELITE InGenius** e no **ELITE BeGenius** com o ácido nucleico extraído das seguintes amostras clínicas identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais, e colhidas, transportadas e armazenadas sob as condições seguintes.

Tipo de amostra	Condições de transporte/armazenamento
	+16 / +26 °C (temperatura ambiente)
Sangue periférico colhido em EDTA ou em citrato de sódio	dentro de 24 horas e o mais tardar de 48 horas
Nota: As amostras têm de ser pré-tratadas para isolar os leucócitos no sangue periférico (PBL) antes da utilização, de acordo com o procedimento descrito nas instruções de utilização completas.	

Procedimentos do ELITE InGenius

O utilizador é guiado passo a passo pela interface gráfica do utilizador do software ELITE InGenius para configurar a execução. Todos os passos: extração, transcrição reversa, PCR em tempo real e a interpretação dos resultados são realizados automaticamente. Estão disponíveis dois modos operacionais: execução completa (Extract + PCR (Extrair+PCR)) ou PCR Only (Apenas PCR).

NOTE

Com o produto BCR-ABL Dx ELITE MGB Kit, devem ser realizadas duas ações para cada amostra: uma com BCR-ABL a2 PCR Mix (para todas as isoformas BCR-ABL a2) e a outra com BCR-ABL a3 PCR Mix (para todas as isoformas BCR-ABL a3).

Antes da análise

1. Ligue o ELITE InGenius. Inicie sessão com o nome de utilizador e a palavra-passe. Selecione o modo "CLOSED" (Fechado).	2. Verifique os controlos: BCR-ABL a2 Positive Control / BCR-ABL a3 Positive Control e BCR-ABL a2 Negative Control / BCR-ABL a3 Negative Control no menu "Controls" (Controlos). Nota: Todos devem ter sido executados, aprovados e não ter expirado.	3. Descongele os tubos BCR-ABL a2 PCR Mix / BCR-ABL a3 PCR Mix. Submeta a vórtice suave. Centrifugue durante 5 s.
4. Prepare a mistura de reação completa		
Número de amostras (N)	BCR-ABL a2 PCR Mix e BCR-ABL a3 PCR Mix	RT EnzymeMix
$1 \leq N \leq 5$	$(N + 1) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 1) \times 0,3 \mu\text{L}$
$6 \leq N \leq 11$	$(N + 2) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 2) \times 0,3 \mu\text{L}$
$N = 12$	$290 \mu\text{L}$	$4,4 \mu\text{L}$
5. Submeta a vórtice suave Centrifugue durante 5 s. Mantenha mistura de reação completa em gelo. Não exponha à luz direta.		

Procedimento 1 - Execução completa: Extract + PCR (Extrair+PCR) (p. ex., amostras)

1. Selecione "Perform Run" (Executar) no ecrã tátil	2. Verifique os volumes de extração: Entrada: "200 μL ", eluição: "100 μL "	3. Leia os códigos de barras das amostras com um leitor de códigos de barras manual ou escreva a identificação da amostra.
4. Selecione o "Assay protocol" (Protocolo de ensaio) de interesse: BCR-ABL a2 ELITE_PBL_200_100 e BCR-ABL a3 ELITE_PBL_200_100	5. Para o protocolo de ensaio a2: Selecione o método "Extract + PCR" (Extrair + PCR) e a posição da amostra "Extraction Tube" (Tubo de extração). Para o protocolo de ensaio a3: Selecione o método "PCR Only" (apenas PCR) e selecione como posição da amostra a via da amostra.	6. Carregue a misturas de reação completa no Inventory Block (Gestor do reagente)
7. Carregar: PCR cassette, cartucho de extração SP RNA, tubos de DNase I, Elution tube (Tubo de eluição), Cassete de pontas, Extraction Tube racks (Suportes de tubo de extração).	8. Feche a porta. Iniciar a execução.	9. Visualize, aprove e guarde os resultados.

NOTE

Se for necessário um modo Apenas extração, consulte o manual do utilizador do instrumento para obter informações sobre o procedimento.

Procedimento 2: PCR Only (Apenas PCR) (p. ex., eluatos, controlos)

1. Selecione "Perform Run" (Executar) no ecrã tátil	2. Verifique os volumes de extração: Entrada: "200 µL", eluição: "100 µL"	3. Leia os códigos de barras das amostras com um leitor de códigos de barras manual ou escreva a identificação da amostra.
4. Selecione o "Assay protocol" (Protocolo de ensaio) de interesse: BCR-ABL a2 ELiTe_PBL_200_100 e BCR-ABL a3 ELiTe_PBL_200_100 o BCR-ABL a2 ELiTe_PC o BCR-ABL a3 ELiTe_PC o BCR-ABL a2 ELiTe_NC ou BCR-ABL a3 ELiTe_NC	5. Selecione o método "PCR Only" (apenas PCR). Para controlos e o protocolo de ensaio a2, selecione a posição da amostra "Elution tube" (Tubo de eluição). Para o protocolo de ensaio a3, selecione como posição da amostra a via de eluição.	6. Carregue a misturas de reação completa no Inventory Block (Gestor do reagente)
7. Carregue o Rack de PCR Cassette e suporte de tubos de eluição com o ácido nucleico extraído	8. Feche a porta. Iniciar a execução.	9. Visualize, aprove e guarde os resultados.

Procedimentos do ELiTe BeGenius

O utilizador é guiado passo a passo pela interface gráfica do utilizador do software ELiTe BeGenius para configurar a execução. Todos os passos: extração, transcrição reversa, PCR em tempo real e a interpretação dos resultados são realizados automaticamente. Estão disponíveis dois modos operacionais: execução completa (Extract + PCR (Extrair+PCR)) ou PCR Only (Apenas PCR).

NOTE

Com o produto BCR-ABL Dx ELiTe MGB Kit, devem ser realizadas duas ações para cada amostra: uma com BCR-ABL a2 PCR Mix (para todas as isoformas BCR-ABL a2) e a outra com BCR-ABL a3 PCR Mix (para todas as isoformas BCR-ABL a3).

Antes da análise

1. Ligue o ELiTe BeGenius. Inicie sessão com o nome de utilizador e a palavra-passe. Selecione o modo "CLOSED" (Fechado).	2. Verifique os controlos: BCR-ABL a2 Positive Control / BCR-ABL a3 Positive Control e BCR-ABL a2 Negative Control / BCR-ABL a3 Negative Control no menu "Controls" (Controlos). Nota: Todos devem ter sido executados, aprovados e não ter expirado.	3. Descongele os tubos BCR-ABL a2 PCR Mix / BCR-ABL a3 PCR Mix . Submeta a vórtice suave. Centrifugue durante 5 s.
---	---	---

4. Prepare a mistura de reação completa			5. Submeta a vórtice suave. Centrifugue durante 5 s. Mantenha mistura de reação completa em gelo. Não exponha à luz direta.
Número de amostras (N)	BCR-ABL a2 PCR Mix e BCR-ABL a3 PCR Mix	RT EnzymeMix	
$1 \leq N \leq 5$	$(N + 1) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 1) \times 0,3 \mu\text{L}$	
$6 \leq N \leq 11$	$(N + 2) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 2) \times 0,3 \mu\text{L}$	
$N = 12$	290 µL	4,4 µL	
$13 \leq N \leq 18$	$(N + 3) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 3) \times 0,3 \mu\text{L}$	
$19 \leq N \leq 23$	$(N + 4) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 4) \times 0,3 \mu\text{L}$	
$N = 24$	580 µL	8,7 µL	

Procedimento 1 - Execução completa: Extract + PCR (Extrair+PCR) (p. ex., amostras)

1. Selecione "Perform Run" (Executar) no ecrã tátil e, a seguir, clique no modo de execução "Extract + PCR" (Extrair+PCR)	2. Insira o rack de amostras com as amostras com código de barras na Cooler Unit. Leia os códigos de barras das amostras ou escreva a identificação da amostra	3. Verifique os volumes de extração: Entrada: "200 µL", eluato: "100 µL"
4. Selecione o "Assay protocol" (Protocolo de ensaio) de interesse: BCR-ABL a2 ELITE_PBL_200_100 e BCR-ABL a3 ELITE_PBL_200_100	5. Imprima as etiquetas para colocar um código de barras nos tubos de eluição vazios. Carregue os tubos no rack de eluição e insira-o na Cooler Unit	6. Carregue a mistura de reação completa no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição) e insira-o na Cooler Unit
7. Carregue o "PCR Rack" (rack de PCR) com a "PCR Cassette" (Cassete de PCR) e o "Extraction Rack" (Rack de extração) com os cartuchos de extração "ELITE InGenius SP RNA", os "ELITE InGenius DNase I tubes" (tubos de DNase I ELITE InGenius) e os consumíveis de extração requeridos.	8. Feche a porta. Iniciar a execução.	9. Visualize, aprove e guarde os resultados.

NOTE

Se for necessário um modo Apenas extração, consulte o manual do utilizador do instrumento para obter informações sobre o procedimento.

Procedimento 2: PCR Only (Apenas PCR) (p. ex., eluatos, controlos)

1. Selecione "Perform Run" (Executar) no ecrã tátil e, a seguir, clique no modo de execução "PCR Only" (Apenas PCR)	2. Carregue os tubos com código de barras do ácido nucleico extraído ou dos controlos no rack de eluição e insira-o na Cooler Unit.	3. Verifique os volumes de extração: Entrada: "200 µL", eluato: "100 µL"
4. Selecione o "Assay protocol" (Protocolo de ensaio) de interesse: BCR-ABL a2 ELITE_PBL_200_100 e BCR-ABL a3 ELITE_PBL_200_100 ou BCR-ABL a2 ELITE_PC ou BCR-ABL a3 ELITE_PC ou BCR-ABL a2 ELITE_NC ou BCR-ABL a3 ELITE_NC	5. Carregue a mistura de reação completa no "Reagent/Elution Rack" (Rack de reagente/eluição) e insira-o na Cooler Unit	6. Carregue o "PCR Rack" com "PCR Cassette"
7. Feche a porta. Iniciar a execução.	8. Visualize, aprove e guarde os resultados.	

ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185, 10149 Torino ITÁLIA
Tel. +39-011 976 191
Fax +39-011 936 76 11
E-mail: emd.support@elitechgroup.com
Website: www.elitechgroup.com

