

Xpert® BCR-ABL Ultra

REF GXBCRABL-US-10

For Information Only - Not a Controlled Copy

Trademark, Patents and Copyright Statements

Cepheid®, the Cepheid logo, GeneXpert®, Xpert®, and Xpertise™ are trademarks of Cepheid.

All other trademarks are property of their respective owners.

THE PURCHASE OF THIS PRODUCT CONVEYS TO THE BUYER THE NON-TRANSFERABLE RIGHT TO USE IT IN ACCORDANCE WITH THIS PACKAGE INSERT. NO OTHER RIGHTS ARE CONVEYED EXPRESSLY, BY IMPLICATION OR BY ESTOPPEL. FURTHERMORE, NO RIGHTS FOR RESALE ARE CONFERRED WITH THE PURCHASE OF THIS PRODUCT.

© Cepheid 2020-2021. All rights reserved.

Declarações relativas a marcas registadas, patentes e copyright

Cepheid®, o logótipo da Cepheid, GeneXpert®, Xpert® e Xpertise™ são marcas comerciais da Cepheid.

Todas as restantes marcas comerciais pertencem aos respetivos proprietários.

A AQUISIÇÃO DESTE PRODUTO ATRIBUI AO COMPRADOR O DIREITO NÃO TRANSFERÍVEL DE O UTILIZAR DE ACORDO COM ESTE FOLHETO INFORMATIVO. NENHUNS OUTROS DIREITOS SÃO ATRIBUÍDOS EXPRESSAMENTE, POR IMPLICAÇÃO OU POR PRECLUSÃO. ALÉM DISSO, NÃO SE CONFEREM NENHUNS DIREITOS DE REVENDA COM A AQUISIÇÃO DESTE PRODUTO.

© Cepheid 2020-2021. Todos os direitos reservados.



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189 USA
Tel.: + 1 408 541 4191
Fax: + 1 408 541 4192
Linha grátis de assistência técnica: + 1 888 838 3222

Xpert® BCR-ABL Ultra

Para utilização em diagnóstico *in vitro*



1. Nome proprietário

Xpert® BCR-ABL Ultra

2. Nome comum ou usual

Xpert BCR-ABL Ultra

3. Utilização prevista

O teste Xpert BCR-ABL Ultra é um teste de diagnóstico *in vitro* para a quantificação de transcritos de mRNA de BCR-ABL1 e ABL1 em amostras de sangue periférico provenientes de pacientes diagnosticados com leucemia mieloide crônica (LMC) positivo t(9;22), expressando transcritos de fusão BCR-ABL tipo e13a2 e/ou e14a2. O teste utiliza a transcrição reversa/reação em cadeia da polimerase quantitativa e em tempo real (RT-qPCR). O teste Xpert BCR-ABL Ultra destina-se a medir as proporções percentuais entre BCR-ABL1 e ABL1 na escala internacional (International Scale, *IS*), também expressas como redução molecular em logaritmo (valor MR) a partir de uma linha de base de 100% (*IS*), em pacientes com LMC positivo t(9;22) durante a monitorização do tratamento com inibidores da tirosina cinase (Tyrosine Kinase Inhibitors, TKIs).

O teste não diferencia entre os transcritos de fusão e13a2/b2a2 ou e14a2/b3a2 e não monitoriza outros transcritos de fusão raros resultantes de t(9;22). Este teste não se destina a diagnosticar LMC.

O teste Xpert BCR-ABL Ultra destina-se apenas à utilização nos sistemas GeneXpert® Dx e GeneXpert Infinity da Cepheid.

4. Resumo e explicação

A leucemia mieloide crônica (LMC) é um dos tumores malignos hematológicos mais frequentes que contribui para 15-20% de todos os casos de leucemia.¹ A incidência de LMC é de aproximadamente 1,8/100 000, o que significa que será diagnosticada LCM a 1 em cada 55 555 homens e mulheres durante a vida.² Mais de 95% dos pacientes com LMC têm o cromossoma Philadelphia (Ph1) característico, que resulta de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22.² A translocação envolve a transferência do gene de Abelson ou ABL1 (ABL) do cromossoma 9 para a breakpoint cluster region (BCR) do cromossoma 22, o que resulta num gene de fusão BCR-ABL1 (BCR-ABL). O gene de fusão produz BCR-ABL, uma tirosina quinase com atividade desregulada que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da LMC.³ O Xpert BCR-ABL Ultra detecta os transcritos de mRNA de translocação dos cromossomas para forma p210 resultante de dois breakpoints major, translocações e13a2/b2a2 e e14a2/b3a2.

A utilidade clínica da monitorização dos níveis de mRNA BCR-ABL por RT-PCR foi estabelecida no Estudo Internacional Aleatório sobre Interferão e STI571 (International Randomized Study of Interferon and STI571 — IRIS), no qual os pacientes receberam terapia com interferão e/ou tratamento com inibidor da tirosina quinase (TKI). Os resultados de BCR-ABL foram normalizados ao abrigo de uma linha de base padronizada comum aos três laboratórios participantes no ensaio.⁴ Posteriormente, foi proposto que os ensaios de monitorização de BCR-ABL estão em conformidade com uma escala internacional (*IS*) e devem ser anexados a dois valores definidos no ensaio IRIS, permitindo assim que os resultados sejam expressos numa escala comum.⁵ O primeiro destes é a linha de base padronizada que representa 100% (*IS*). O segundo é a Resposta Molecular Maior (Major Molecular Response, MMR), que é definida como uma redução de 3 logaritmos a partir da base de dados padronizada que representa 0,10% (*IS*)/MR3. Uma redução de 3 logaritmos está associada a um resultado de sobrevivência favorável.⁶ Deste modo, os testes moleculares padronizados para a *IS* podem ser uma ajuda essencial para os médicos no tratamento de pacientes com LCM.⁶

O Xpert BCR-ABL Ultra quantifica o nível de ARNm BCR-ABL como % (*IS*) através da calibração do ensaio com o painel de referência genética da Organização Mundial da Saúde (OMS) para quantificação de ARNm BCR-ABL. De acordo com as recomendações publicadas⁷, a Cepheid desenvolveu e validou padrões quantitativos secundários em linha com o painel de referência principal da OMS. Isto permite a determinação de um fator de conversão específico do lote, incluindo a eficiência (*E*) do ensaio e o fator de escala (Scaling Factor, *SF*) de cada lote dos kits Xpert BCR-ABL Ultra. A eficácia da calibração relativa aos padrões secundários é monitorizada regularmente.

5. Princípio do procedimento

O Xpert BCR-ABL Ultra é um teste automatizado para quantificação do transcrito BCR-ABL como uma proporção BCR-ABL/ABL. O teste utiliza a reação em cadeia da polimerase através de transcrição reversa quantitativa e em tempo real (RT-qPCR).

O teste é efetuado nos sistemas GeneXpert Dx e GeneXpert Infinity da Cepheid. Os sistemas GeneXpert automatizam e integram a purificação de amostras, a amplificação de ácidos nucleicos e a detecção de sequência-alvo em amostras simples ou complexas utilizando ensaios de RT-PCR e PCR. Os sistemas são constituídos por um instrumento, um computador e software pré-carregado para execução de testes e visualização dos resultados. Os sistemas requerem a utilização de cartuchos GeneXpert descartáveis, de utilização única que contêm os reagentes de RT-PCR e PCR e onde decorrem as reações. Para obter uma descrição completa dos sistemas, consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx* ou o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Infinity*.

O ensaio Xpert BCR-ABL Ultra inclui reagentes de detecção dos genes de fusão BCR-ABL resultantes de dois major breakpoints p210, translocações e13a2/b2a2 e e14a2/b3a2 e o transcrito ABL como um controlo endógeno em amostras de sangue periférico.^{7,8,9,10,11} O valor do transcrito BCR-ABL na amostra do paciente é apresentado como a proporção de BCR-ABL/ABL, bem como uma redução molecular em logaritmo (valor MR) a partir de uma linha de base de 100% na escala internacional (IS), utilizando o software GeneXpert.

Há dois controlos incluídos em cada teste Xpert BCR-ABL Ultra, que são controlo endógeno ABL e controlo de verificação da sonda (Probe Check Control, PCC). O controlo endógeno ABL normaliza o BCR-ABL alvo e assegura que a amostra usada no ensaio é suficiente. O PCC verifica a reidratação dos reagentes, o enchimento do tubo de PCR e a presença e a funcionalidade de todos os componentes da reação no cartucho, incluindo sondas e corantes.

6. Reagentes e instrumentos

6.1 Materiais fornecidos



O kit Xpert BCR-ABL Ultra (GXBCRABL-US-10) contém reagentes suficientes para o processamento de 10 amostras ou amostras de controlo de qualidade. O kit contém o seguinte:

Reagentes para o Xpert BCR-ABL Ultra

- | | |
|---|--------------------------------|
| | 10 unidade por cada kit |
| • Proteinase K (PK) | 10 x 130 µl por frasco |
| • Reagente de lise (LY) (cloreto de guanidínio) | 10 x 5,3 ml por frasco |
| • Reagente de lavagem (1) | 10 x 2,9 ml por ampola |
| • Etanol | |
| • Tiocianato de guanidínio | |

Cartuchos do ensaio Xpert BCR-ABL Ultra com tubos de reação integrados

- | | |
|--------------------------------------|------------------------|
| | 10 por kit |
| • Esferas 1, 2, 3 e 4 (liofilizadas) | 1 de cada por cartucho |
| • Reagente de enxaguamento | 2,0 ml por cartucho |
| • Reagente de eluição | 2,5 ml por cartucho |

CD

- | | |
|---|------------------|
| | 1 por kit |
| • Ficheiro de definição do ensaio (ADF — Assay Definition File) | |
| • Instruções para importar o ADF para o software GeneXpert | |
| • Instruções de utilização (folheto informativo) | |

Certificado de análise

1 por kit

Nota As Fichas de Dados de Segurança (FDS) estão disponíveis em www.cepheid.com ou www.cepheidinternational.com, no separador ASSISTÊNCIA (SUPPORT).

Nota A seroalbumina bovina (Bovine Serum Albumin, BSA) presente nas esferas deste produto foi produzida e fabricada a partir de plasma bovino proveniente exclusivamente dos EUA. Os animais não foram alimentados com nenhuma proteína de ruminante ou outra proteína animal e foram aprovados nos testes ante- e post-mortem. Durante o processamento, não houve mistura do material com outros materiais de origem animal.

6.2 Materiais necessários mas não fornecidos

- Sistemas do instrumento GeneXpert Dx ou sistemas GeneXpert Infinity (o número de catálogo varia consoante a configuração): Instrumento GeneXpert, computador, leitor de código de barras, manual do utilizador.
 - Para o sistema GeneXpert Dx: Software GeneXpert Dx, versão 5.1 ou posterior
 - Para sistemas GeneXpert Infinity-80 e Infinity-48s: Software Xpertise versão 6.6 ou posterior
- Impressora: Caso necessite de uma impressora, contacte a assistência técnica da Cepheid para tratar da aquisição de uma impressora recomendada.
- Agitador de vórtice
- Microcentrifugadora (1000 × g mínimo)
- Pipetas e pontas de pipeta com filtro para aerossóis
- Tubos cónicos de 50 ml
- Etanol absoluto grau reagente

6.3 Materiais recomendados mas não fornecidos

Painel IS Xpert BCR-ABL C130, número de catálogo C130 são controlos de qualidade da Maine Molecular Quality Controls, Inc.

7. Conservação e manuseamento



- Conserve os cartuchos Xpert BCR-ABL Ultra a 2 °C – 8 °C até ao prazo de validade indicado no rótulo.
- Abra a tampa do cartucho apenas quando estiver pronto para realizar o ensaio.
- Não utilize cartuchos fora do prazo de validade.
- O reagente de lavagem é um líquido transparente e incolor. Não utilize o reagente de lavagem se este ficar turvo ou descolorido.
- Vinte minutos antes de iniciar o procedimento, remova a amostra de sangue, o cartucho e os reagentes de preparação da amostra do local de conservação para permitir que atinjam a temperatura ambiente (20 °C – 30 °C).

8. Advertências e precauções

8.1 Gerais

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Para utilização apenas com receita médica.



Trate todas as amostras biológicas, incluindo os cartuchos e reagentes usados, como sendo capazes de transmitir agentes infecciosos. Dado que é frequentemente impossível saber quais as amostras biológicas que poderão ser infecciosas, todas devem ser tratadas aplicando as precauções padrão. Orientações para o manuseamento de amostras estão disponíveis nos CDC (Centers for Disease Control and Prevention)¹² dos EUA e no Clinical and Laboratory Standards Institute.¹³

Siga os procedimentos de segurança determinados pela sua instituição para trabalhar com químicos e manusear amostras biológicas.

As características do desempenho deste teste foram determinadas com sangue colhido apenas em tubos com EDTA. Não se avaliou o desempenho deste teste com outros tipos de amostras.

Resultados fiáveis dependem da colheita, transporte, conservação e processamento adequados das amostras. Podem ocorrer resultados de teste incorretos devido a incorreções na colheita, no manuseamento ou na conservação da amostra, erro técnico, troca de amostras ou por o transcrito-alvo na amostra ser inferior ao limite de deteção do teste. Para se evitarem resultados erróneos, é necessário o seguimento cuidadoso das instruções do folheto informativo e dos *Manuais do utilizador do sistema GeneXpert Dx* e do *sistema GeneXpert Infinity*.

A execução do teste Xpert BCR-ABL Ultra fora dos intervalos de tempo e temperatura de conservação recomendados pode produzir resultados erróneos ou inválidos.

Amostras biológicas, dispositivos de transferência e cartuchos usados devem ser considerados como tendo potencial de transmissão de agentes infecciosos que exigem precauções padrão. Siga os procedimentos relativos a resíduos ambientais da sua instituição relativamente à eliminação correta de cartuchos usados e reagentes não usados. Estes materiais podem apresentar características de resíduos químicos perigosos que exigem procedimentos de eliminação nacionais ou regionais específicos. Se as regulamentações nacionais ou regionais não disponibilizarem uma indicação clara sobre a eliminação correta, as amostras biológicas e os cartuchos usados devem ser eliminados de acordo com as diretrizes relativas ao manuseamento e à eliminação de resíduos médicos da OMS (Organização Mundial da Saúde).¹⁴

8.2 Amostra

Manter condições de conservação adequadas durante o transporte da amostra, para assegurar a integridade da amostra (ver Secção 10. Colheita, transporte e conservação de amostras). Não foi avaliada a estabilidade da amostra em condições de transporte que não as recomendadas.

Não congelar amostras de sangue total.

A colheita, a conservação e o transporte corretos da amostra são essenciais para resultados corretos.

8.3 Teste/reagente

Não substitua os reagentes do Xpert BCR-ABL Ultra por outros reagentes.

Não abra a tampa de um cartucho do ensaio Xpert BCR-ABL Ultra, exceto para adicionar a amostra e o reagente de lavagem.

Não utilize um cartucho que tiver caído depois de o ter retirado da embalagem.

Não agite o cartucho. Agitar ou deixar cair o cartucho após a abertura da respetiva tampa pode produzir resultados inválidos.

Não coloque o rótulo de ID da amostra na tampa do cartucho nem na etiqueta de código de barras do cartucho.

Não utilize um cartucho que tenha uma etiqueta de código de barras danificada.

Não utilize um cartucho que tenha um tubo de reação danificado.

Recomenda-se que os cartuchos do Xpert BCR-ABL Ultra estejam à temperatura ambiente (20 °C – 30 °C) aquando da utilização no teste.

② Cada cartucho de utilização única do ensaio Xpert BCR-ABL Ultra é utilizado para processar um teste. Não reutilize cartuchos processados.

② Não reutilize pontas de pipetas.

Não utilize um cartucho se este parecer húmido ou se o selo da tampa parecer estar partido.

Não utilize o cartucho do ensaio Xpert BCR-ABL Ultra se tiver adicionado um reagente na abertura errada.

Não abra os cartuchos do Xpert BCR-ABL Ultra depois de o teste ter sido concluído.

Contagens de glóbulos brancos excessivamente elevadas podem causar a acumulação de pressão no cartucho e originar a interrupção das execuções do ensaio.


Utilize um conjunto de pipetas e reagentes exclusivos para preparação de amostras.

Use batas limpas e luvas. Troque de luvas entre o processamento de cada amostra.

Na eventualidade de derrame da amostra ou dos controlos, use luvas e absorva o derrame com toalhetes de papel. Em seguida, limpe minuciosamente a área contaminada com uma diluição de 1:10 de lixívia doméstica à base de cloro. A concentração de cloro ativo final deve ser de 0,5%, independentemente da concentração da lixívia doméstica usada no seu país. Aguarde no mínimo dois minutos de contacto. Certifique-se de que a área de trabalho está seca utilizando etanol a 70% desnaturado para remover os resíduos de lixívia. Aguarde até que a superfície seque completamente antes de prosseguir. Em alternativa, siga os procedimentos padrão da sua instituição para casos de contaminação ou derrame. Para o equipamento, siga as recomendações do fabricante para a descontaminação do equipamento.

9. Perigos químicos^{15, 16}

Nota A informação seguinte aplica-se a todo o produto contendo proteinase K e reagentes de lise, lavagem e enxaguamento.

- Pictograma de perigo CLP/GHS: 
- Palavra-sinal: PERIGO

Advertências de perigo GHS da ONU

- Líquido e vapor facilmente inflamáveis
- Provoca irritação cutânea
- Provoca irritação ocular grave
- Pode provocar sonolência ou vertigens
- Suspeito de provocar anomalias genéticas

Recomendações de prudência GHS da ONU

- **Prevenção**
 - Pedir instruções específicas antes da utilização.
 - Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança.
 - Manter afastado do calor, faísca, chama aberta e/ou superfícies quentes. Não fumar.
 - Manter o recipiente bem fechado.
 - Evitar respirar névoas/vapores/aerossóis.
 - Lavar cuidadosamente após manuseamento.
 - Utilizar apenas ao ar livre ou em locais bem ventilados.
 - Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.
 - Usar o equipamento de proteção individual exigido.
- **Resposta**
 - Em caso de incêndio: para a extinção utilizar os meios adequados.
 - EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.
 - Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTI-VENENOS ou um médico.
 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): despir/retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche.
 - Tratamento específico, ver informação de primeiros-socorros suplementar.
 - Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.
 - Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.
 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.
 - Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.
 - EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.
 - Conservar em ambiente fresco.
 - Armazenar em local bem ventilado. Manter o recipiente bem fechado.
 - Armazenar em local fechado à chave.
 - Eliminar o conteúdo e/ou recipiente de acordo com a regulamentação local, regional, nacional e/ou internacional.

10. Colheita, transporte e conservação de amostras

- As amostras de sangue total devem ser colhidas em tubos com EDTA de acordo com as diretrizes da instituição. As amostras devem ser conservadas a 4 °C por um período máximo de 3 dias (72 horas) antes de serem testadas. O plasma de células não deve ser separado.
- A colheita, a conservação e o transporte adequados das amostras são fundamentais para o desempenho deste teste. Não foi avaliada a estabilidade da amostra com o ensaio Xpert BCR-ABL Ultra noutras condições de transporte e conservação além das indicadas em baixo.

11. Procedimento

11.1 Antes de começar

Vinte (20) minutos antes de iniciar o procedimento, remova a amostra de sangue e os reagentes de preparação da amostra (incluindo os cartuchos) do local de conservação refrigerado para permitir que atinjam a temperatura ambiente e centrifugue brevemente a proteinase K (PK) numa centrifugadora.

Importante Caso utilize um instrumento GeneXpert Dx, inicie o teste no espaço de 1 hora após a adição da amostra tratada com reagente de amostra ao cartucho. Se utilizar um sistema GeneXpert Infinity, certifique-se de que inicia o teste e coloca o cartucho no tapete rolante no espaço de 15 minutos após a adição da amostra tratada com reagente de amostra ao cartucho. O prazo de validade restante é registado pelo sistema com o software Xpertise de modo a que os testes sejam executados antes do final do período de uma hora no instrumento.

Importante Remova o cartucho da embalagem de cartão antes de preparar a amostra. (Ver Secção 11.3, Preparação do cartucho)

11.2 Preparação da amostra

1. No fundo de um tubo cónico de 50 ml novo adicione 100 µl de PK (Proteinase K).
2. Certifique-se de que a amostra de sangue é bem misturada, invertendo 8 vezes o tubo de colheita imediatamente antes da pipetagem. Consulte as instruções do fabricante para cada tipo de tubo de colheita de sangue com EDTA.
3. Ao tubo já contendo a proteinase K, adicione 4 ml da amostra de sangue.
4. Agite a amostra em vórtex continuamente à velocidade máxima durante 3 segundos.
5. Incube à temperatura ambiente durante 1 minuto.
6. Ao mesmo tubo adicione 2,5 ml de reagente de lise (LY).

Nota Conserve o restante reagente de lise para utilizar novamente no Passo 13.

7. Agite a amostra em vórtex continuamente à velocidade máxima durante 10 segundos.
8. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
9. Agite a amostra em vórtex continuamente à velocidade máxima durante 10 segundos.
10. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
11. Misture a amostra batendo levemente 10 vezes no fundo do tubo.
12. Transfira 1 ml do lisado preparado para um novo tubo cónico de 50 ml.

Nota O lisado restante pode ser conservado a 4 °C até 4 horas ou conservado a -20 °C ou menos durante 24 horas no máximo.

13. Ao novo tubo cónico contendo o lisado, adicione 1,5 ml de reagente de lise (LY) conservado no Passo 6.
14. Agite a amostra em vórtex continuamente à velocidade máxima durante 10 segundos.
15. Incube à temperatura ambiente durante 10 minutos.
16. Ao mesmo tubo cónico adicione 2 ml de etanol absoluto grau reagente (fornecido pelo utilizador).
17. Agite a amostra em vórtex continuamente à velocidade máxima durante 10 segundos. Ponha de parte.
18. Elimine o remanescente dos reagentes PK ou LY.

11.3 Preparação do cartucho

Para adicionar a amostra ao cartucho Xpert BCR-ABL Ultra:

1. Remova o cartucho da embalagem.
2. Inspeccione o cartucho para verificar se existem danos. Não utilize se estiver danificado.
3. Abra o cartucho levantando a tampa e transfira todo o conteúdo da ampola do reagente de lavagem (1) para a câmara do reagente de lavagem (com a abertura pequena). Ver Figura 1.

4. Pipete a totalidade da amostra preparada para a câmara de amostra (abertura grande). Ver Figura 1.

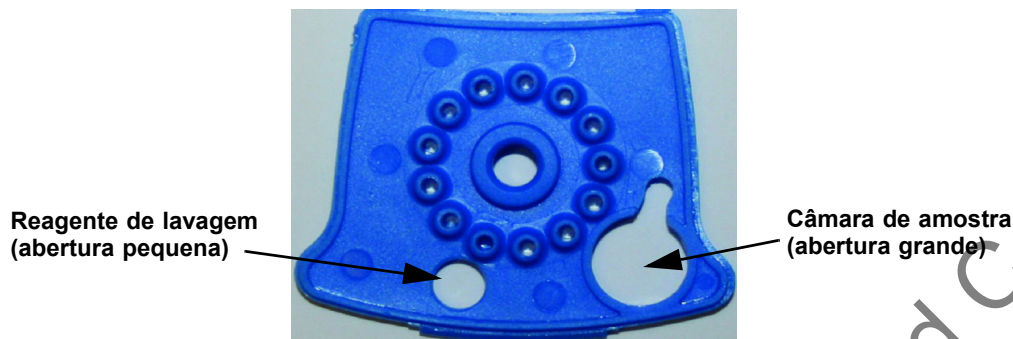


Figura 1. Cartucho Xpert BCR-ABL Ultra (vista superior)

5. Feche a tampa do cartucho. Certifique-se de que a tampa fica bem fechada. Inicie o teste (ver Secção 11.5, Iniciar o teste).

11.4 Controlos externos

Os controlos externos descritos na Secção 6.3, Materiais recomendados mas não fornecidos estão disponíveis, mas não são fornecidos e podem ser utilizados em conformidade com as organizações de acreditação locais, estaduais e federais, consoante aplicável.

Para executar um controlo utilizando o Xpert BCR-ABL Ultra, execute os seguintes passos:

1. Aguarde que os controlos do Painel IS Xpert BCR-ABL C130 atinjam a temperatura ambiente (20 °C – 30 °C), aproximadamente 30 minutos.
2. Imediatamente antes da utilização, misture o controlo externo invertendo o respetivo tubo 5 a 10 vezes e, em seguida, agite brevemente o tubo no agitador de vórtex, a velocidade média, durante 10 a 15 segundos.
3. No fundo de um tubo cónico de 50 ml novo adicione 100 µl de PK (Proteinase K).
4. Ao tubo já contendo a proteinase K, adicione 4 ml do controlo externo.
5. Agite o controlo externo no agitador de vórtex continuamente, à velocidade máxima, durante 3 segundos.
6. Incube à temperatura ambiente durante 1 minuto.
7. Ao mesmo tubo adicione 2,5 ml de reagente de lise (LY).

Nota Conserve o restante reagente de lise para utilizar novamente no Passo 14.

8. Agite o controlo externo no agitador de vórtex continuamente, à velocidade máxima, durante 10 segundos.
9. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
10. Agite o controlo externo no agitador de vórtex continuamente, à velocidade máxima, durante 10 segundos.
11. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
12. Misture o controlo externo batendo levemente 10 vezes no fundo do tubo.
13. Transfira 1 ml da amostra do controlo externo preparado para um novo tubo cónico de 50 ml.
14. Ao novo tubo cónico contendo a amostra do controlo externo, adicione 1,5 ml de reagente de lise (LY) conservado no Passo 7.
15. Agite o controlo externo no agitador de vórtex continuamente, à velocidade máxima, durante 10 segundos.
16. Incube à temperatura ambiente durante 10 minutos.
17. Ao mesmo tubo cónico adicione 2 ml de etanol absoluto grau reagente (não fornecido).
18. Agite o controlo externo no agitador de vórtex continuamente, à velocidade máxima, durante 10 segundos.
19. Abra o cartucho levantando a tampa e transfira todo o conteúdo da ampola do reagente de lavagem (1) para a câmara do reagente de lavagem (com a abertura pequena). Ver Figura 1.
20. Pipete a totalidade do controlo externo preparado para a câmara de amostra (abertura grande). Ver Figura 1.
21. Feche a tampa do cartucho. Inicie o teste (ver Secção 11.5, Iniciar o teste).

11.5 Iniciar o teste

Importante Caso utilize um instrumento GeneXpert Dx, inicie o teste no espaço de 1 hora após a adição da amostra ao cartucho. Caso utilize um sistema GeneXpert Infinity, certifique-se de que inicia o teste e coloca o cartucho no tapete rolante no prazo de 15 minutos após a adição da amostra ao cartucho. O prazo de validade restante é controlado pelo sistema com o software Xpertise de modo a que os testes sejam executados antes do final do período de uma hora no instrumento.

Importante Antes de iniciar o teste, certifique-se de que o sistema está a executar o software GeneXpert Dx versão 5.1 ou superior ou o software Infinity Xpertise versão 6.6 ou superior, e de que o ficheiro de definição do ensaio (ADF — Assay Definition File) do Xpert BCR-ABL Ultra é importado para o software. Esta secção enumera os passos predefinidos para utilizar o sistema GeneXpert Dx e o sistema GeneXpert Infinity. Para obter instruções detalhadas, consulte o Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx ou o Manual do utilizador do sistema GeneXpert Infinity, dependendo do modelo que estiver a utilizar.

Nota Os passos a seguir poderão ser diferentes se o administrador do sistema tiver alterado o fluxo de trabalho predefinido do sistema.

1. Ligue o sistema GeneXpert:
 - Se estiver a utilizar o sistema GeneXpert Dx, comece por ligar o instrumento GeneXpert Dx e, de seguida, o computador. O software GeneXpert Dx iniciará automaticamente ou pode ser necessário clicar duas vezes no ícone de atalho do software GeneXpert Dx no ambiente de trabalho do Windows.
 - ou
 - Se utilizar o sistema GeneXpert Infinity, ative o instrumento. O software Xpertise iniciará automaticamente ou pode ser necessário clicar duas vezes no ícone de atalho do software Xpertise no ambiente de trabalho do Windows.
2. Inicie sessão no software do GeneXpert utilizando o seu nome de utilizador e palavra-passe.
3. Na janela do GeneXpert, clique em **Criar teste (Create Test)** (GeneXpert Dx) ou **Encomendas (Orders)** e em **Encomendar teste (Order Test)** (Infinity). A janela Criar teste (Create Test) abre-se.
4. Leia ou introduza a ID do paciente (Patient ID) (opcional). Se digitar a ID do paciente (Patient ID), assegure-se de que digita a ID do paciente (Patient ID) correta. A ID do paciente (Patient ID) é apresentada do lado esquerdo da janela Ver resultados (View Results) e está associada ao resultado.
5. Leia ou introduza a ID da amostra (Sample ID). Se digitar a ID da amostra (Sample ID), assegure-se de que digita a ID da amostra (Sample ID) correta. A ID da amostra (Sample ID) é apresentada do lado esquerdo da janela Ver resultados (View Results) e está associada ao resultado.
6. Leia o código de barras do cartucho Xpert BCR-ABL Ultra. Utilizando a informação do código de barras, o software preenche automaticamente as caixas dos seguintes campos: ID lote de reagente (Reagent Lot ID), N/S do cartucho (Cartridge S/N) e Prazo de validade (Expiration Date).

Nota Se o código de barras no cartucho do Xpert BCR-ABL Ultra não puder ser lido digitalmente, repita o teste com um novo cartucho.

7. Clique em **Iniciar teste (Start Test)** (GeneXpert Dx) ou **Enviar (Submit)** (Infinity). Digite a sua palavra-passe na caixa de diálogo que surge.
8. Para o sistema **GeneXpert Infinity**, coloque o cartucho no tapete rolante. O cartucho será automaticamente carregado, o teste será executado e o cartucho usado será colocado no recipiente para resíduos.
 - ou
 - No caso do **instrumento GeneXpert Dx**:
 - A. Abra a porta do módulo do instrumento com a luz verde a piscar e carregue o cartucho.
 - B. Feche a porta. O teste começa e a luz verde para de piscar. Quando o teste termina, a luz verde desliga-se.
 - C. Espere até que o sistema destranque o fecho da porta antes de abrir a porta do módulo e retirar o cartucho.
9. Elimine os cartuchos usados nos recipientes para resíduos de amostras apropriados, de acordo com as práticas padrão da sua instituição.

Nota O tempo até à obtenção de resultados é de aproximadamente 2 horas.

12. Visualização e impressão de resultados

Esta secção discrimina os passos básicos para a visualização e a impressão dos resultados. Para instruções detalhadas sobre a visualização e a impressão dos resultados, consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx* ou o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Infinity*.

- Clique no ícone **Ver resultados (View Results)** para visualizar os resultados.
- Após a conclusão do teste, clique no botão **Comunicar (Report)** do ecrã Ver resultados (View Results) para visualizar e/ou gerar um relatório em ficheiro pdf.

13. Controlo de qualidade

CONTROL

Cada cartucho inclui um controlo endógeno ABL e um controlo de verificação da sonda (PCC).

Controlo endógeno ABL — O controlo endógeno ABL confirma que é utilizada amostra suficiente no teste. Adicionalmente, este controlo deteta a inibição do ensaio de PCR em tempo real associada à amostra. O ABL é aprovado se preencher os critérios de aceitação atribuídos.

Controlo de verificação da sonda (PCC) — Antes do início da reação PCR, o sistema GeneXpert mede o sinal de fluorescência das sondas para monitorizar a reidratação da esfera, o enchimento do tubo de reação e a funcionalidade de todos os componentes de reação no cartucho. O PCC é aprovado se preencher os critérios de aceitação atribuídos.

Controlos externos — Podem ser utilizados controlos externos de acordo com organizações de acreditação locais, nacionais e europeias, consoante aplicável.

14. Interpretação dos resultados

Os resultados são automaticamente interpretados pelo sistema GeneXpert por meio da medição de sinais fluorescentes e algoritmos de cálculo integrados, e são apresentados na janela Ver resultados (View Results). Os resultados possíveis e respetivas interpretações são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados e interpretação do Xpert BCR-ABL Ultra

Resultado	Interpretação
POSITIVO (POSITIVE) Ver Figura 2, Figura 3, Figura 4	Transcrito BCR-ABL detetado. <ul style="list-style-type: none"> • BCR-ABL POSITIVO (POSITIVE) – O transcrito BCR-ABL foi detetado e tem um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. • Possíveis resultados positivos: <ul style="list-style-type: none"> • POSITIVO [#,##% (IS) e MR#,##] (POSITIVE [#,##% (IS) and MR#,##]); Figura 2. • POSITIVO [Acima do LQ superior] (POSITIVE [Above upper LoQ]); Figura 3. • POSITIVO [Abaixo do LD; >MR4,52/<0,0030% (IS)] (POSITIVE [Below LoD; MR4.52/0.0030% (IS)]); Figura 4. ABL – APROVADO (PASS) – O transcrito ABL foi detetado e tem um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. <ul style="list-style-type: none"> • Se o valor ABL Ct for inferior a 18, estava presente na reação um número mínimo de 32 000 cópias de ABL.^{17,18} • Verificação da sonda APROVADO (PASS) – Todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
NEGATIVO (NEGATIVE) Ver Figura 5	Não foi detetado transcrito BCR-ABL. <ul style="list-style-type: none"> • BCR-ABL NEGATIVO [Transcrito ABL suficiente] (BCR-ABL NEGATIVE [Sufficient ABL transcript]) – O transcrito BCR-ABL não foi detetado e tem um limiar de ciclo (Ct) acima do ciclo válido. • ABL – APROVADO (PASS) – O transcrito ABL foi detetado e tem um limiar de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint superior ao limiar definido. • Se o valor ABL Ct for inferior a 18, estava presente na reação um número mínimo de 32 000 cópias de ABL.^{17,18} • Verificação da sonda APROVADO (PASS) – Todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.

Tabela 1. Resultados e interpretação do Xpert BCR-ABL Ultra (continuação)

Resultado	Interpretação
INVÁLIDO (INVALID) Ver Figura 6	<p>Não é possível determinar o nível de transcrito BCR-ABL.</p> <ul style="list-style-type: none"> INVÁLIDO (INVALID) – Não é possível determinar o nível de transcrito BCR-ABL porque a amostra contendo BCR-ABL em excesso e/ou transcritos ABL. Ver Secção 17., Guia de resolução de problemas, para instruções adicionais para repetir o teste da amostra. ABL FALHOU (FAIL) – O limiar de ciclo (Ct) de ABL não estava dentro do intervalo válido nem o endpoint estava abaixo da definição de limiar. Figura 6. Ver Secção 17., Guia de resolução de problemas, para instruções adicionais para repetir o teste da amostra. Verificação da sonda – APROVADO (PASS); todos os resultados de verificação da sonda foram aprovados.
ERRO (ERROR) Ver Figura 7	<p>Não é possível determinar o nível de transcrito BCR-ABL. Ver Secção 17., Guia de resolução de problemas, para instruções adicionais para repetir o teste da amostra.</p> <ul style="list-style-type: none"> BCR-ABL – SEM RESULTADO (NO RESULT) ABL – SEM RESULTADO (NO RESULT) Verificação da sonda FALHOU (FAIL) – Um ou todos os resultados de verificação da sonda falharam. Verificação da sonda APROVADO (PASS) ou NA (não aplicável) e abortado por pressão. <p>* Se a verificação da sonda tiver sido aprovada ou apresentar IS, o erro foi causado porque o limite máximo da pressão excedeu o intervalo aceitável ou porque houve falha de um componente do sistema.</p>
SEM RESULTADO (NO RESULT)	<p>Não é possível determinar o nível de transcrito BCR-ABL. Não foram recolhidos dados suficientes para produzir um resultado de teste. Isto pode ocorrer, por exemplo, se o utilizador parou um teste que estava em curso. Ver Secção 17., Guia de resolução de problemas, para instruções adicionais para repetir o teste da amostra.</p> <ul style="list-style-type: none"> BCR-ABL SEM RESULTADO (NO RESULT) ABL SEM RESULTADO (NO RESULT) Verificação da sonda NA (não aplicável)

15. Resultados quantitativos

É fornecido um certificado de análise com cada kit de teste Xpert BCR-ABL Ultra que contém uma curva padrão específica do lote do kit Xpert BCR-ABL Ultra e um valor de eficiência ($E_{A_{CT}}$). O valor de eficiência está integrado no código de barras do cartucho do ensaio Xpert BCR-ABL Ultra. Consulte os cálculos detalhados do valor de eficiência no certificado de análise. Cada lote do kit também contém um fator de escala (SF) específico do lote incorporado no código de barras que calibra o resultado do teste quantitativo com base na Escala Internacional (IS).⁷ Os resultados do teste são apresentados o resultado do teste quantitativo em escala % (IS) e resposta molecular (MR) (ver Tabela 2 e Tabela 3). Estes valores quantitativos devem ser interpretados no âmbito da precisão do teste Xpert BCR-ABL (ver Secção 22., Precisão e reprodutibilidade).

Tabela 2. Correlação entre redução de logaritmo, escala internacional (IS) e resposta molecular (MR)

Redução de logaritmo em % BCR-ABL/ABL (IS)	MR	% BCR-ABL/ABL (IS) ^a
0	0	100
1	1	10
2	2	1
3	3	0,1
4	4	0,01
4,5	4,5	0,0032
5	5	0,001

a. % BCR-ABL/ABL (IS) = % (IS).

$$MR_{xx,x} = \log_{10}[100/\% \text{ determinada (IS)}] = \log_{10}(100) - \log_{10}[\% \text{ determinada (IS)}] = 2 - \log_{10}[\% \text{ determinada (IS)}]$$

Tabela 3. Exemplos de resultados do teste Xpert BCR-ABL Ultra

Teste	BCR-ABL		ABL		Resultados do teste Xpert BCR-ABL Ultra	Notas
	Ct	Resultado	Ct	Resultado		
1	7,1	INVÁLIDO (INVALID)	7,3	FALHOU (FAIL)	INVÁLIDO [Transcritos BCR-ABL e ABL demasiado elevados] (INVALID [Too high BCR-ABL and ABL transcripts])	Valor % calculado: 149,92%
2	8,1	INVÁLIDO (INVALID)	7,9	FALHOU (FAIL)	INVÁLIDO [Transcrito ABL demasiado elevado] (INVALID [Too high ABL transcript])	Valor % calculado: 121,05%
3	7,9	INVÁLIDO (INVALID)	8,1	APROVADO (PASS)	INVÁLIDO [Transcrito BCR-ABL demasiado elevado] (INVALID [Too high BCR-ABL transcript])	Valor % calculado: 149,92%
4	11,4	POSIT.	10,9	APROVADO (PASS)	POSITIVO [Acima do LoQ superior] (POSITIVE [Above upper LoQ])	Valor % calculado: 78,92%
5	18,2	POSIT.	13,5	APROVADO (PASS)	POSITIVO [33,93% (IS) e MR0,47] (POSITIVE [33.93% (IS) and MR0.47])	Valor % calculado: 33,93%
6	21,4	POSIT.	13,4	APROVADO (PASS)	POSITIVO [4,68% (IS) e MR1,33] (POSITIVE [4.68% (IS) and MR1.33])	Valor % calculado: 4,68%
7	28,6	POSIT.	15,2	APROVADO (PASS)	POSITIVO [0,012% (IS) e MR3,92] (POSITIVE [0.012% (IS) and MR3.92])	Valor % calculado: 0,012%
8	30,0	POSIT.	12,7	APROVADO (PASS)	POSITIVO [Abaixo do LoD; >MR4,52/ <0,0030% (IS)] (POSITIVE [Below LoD; MR4.52/0.0030% (IS)])	Valor % calculado: 0,0008%
9	0	NEGAT.	13,3	APROVADO (PASS)	NEGATIVO [Transcrito ABL suficiente] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])	0%
10	31,6	INVÁLIDO (INVALID)	18,2	FALHOU (FAIL)	INVÁLIDO [Transcrito ABL insuficiente] (INVALID [Insufficient ABL transcript])	NA
11	0	INVÁLIDO (INVALID)	18,6	FALHOU (FAIL)	INVÁLIDO [Transcrito ABL insuficiente] (INVALID [Insufficient ABL transcript])	NA
12	0	INVÁLIDO (INVALID)	0	FALHOU (FAIL)	INVÁLIDO [Nenhum transcrito ABL] (INVALID [No ABL transcript])	NA
13	0	SEM RESULTADO (NO RESULT)	0	SEM RESULTADO (NO RESULT)	ERRO (ERROR)	Por exemplo, Erro 5017: [ABL] verificação da sonda falhou

15.1 POSITIVO [#,% (IS) e MR#,##] (POSITIVE [#,% (IS) and MR#,##])

O BCR-ABL foi detetado com um nível de #,% (IS) e MR#,##.

Para um resultado **POSITIVO [#,% (IS) e MR#,##] (POSITIVE [#,% (IS) and MR#,##])**, BCR-ABL é detetável com um ABL Ct igual ou superior a “8” e igual ou inferior ao valor de cutoff de “32” e um ABL Ct igual ou superior a “8” e igual ou inferior a “18”. O software GeneXpert calcula a % (IS) utilizando a seguinte equação em que o valor Delta Ct (ΔCt) é obtido subtraindo o BCR-ABL Ct ao ABL Ct:

$$\% (IS) = E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{fator de escala} (SF)$$

Nota

O fator de escala (SF) é um parâmetro específico do lote que está incorporado no código de barras do cartucho de teste. Os valores deste fator e da eficiência do ensaio específica do lote ($E_{\Delta Ct}$) são determinados em testes de controle de qualidade de cada lote do ensaio usando padrões secundários calibrados para o painel internacional de referência genética da Organização Mundial da Saúde (OMS) para quantificação de transcritos BCR-ABL.⁷ Conjuntamente, os padrões secundários e os valores específicos do lote $E_{\Delta Ct}$ and SF calibram o resultado quantitativo do teste com base na IS. O valor $E_{\Delta Ct}$ está definido para 1,92 e o valor SF está definido para 1,22 para utilizar no exemplo aqui mostrado.

Exemplo: $E_{\Delta Ct}$ específico do lote = 1,92; SF = 1,22
 ABL Ct do ensaio = 11,3; BCR-ABL Ct = 18,0 ; ΔCt = -6,7
 $\% (IS) = 1,92^{(-6,7)} \times 100 \times 1,22 = 1,54\% (IS)$
 $MR_{x,xx} = \log_{10}[100/\% \text{ determinada} (IS)] = \log_{10}(100) - \log_{10}(1,54) = 2 - \log_{10}(1,54) = MR1,81$.

Resultado: **POSITIVO [1,54% (IS) e MR1,81] (POSITIVE [1.54% (IS) and MR1.81])**, Ver Figura 2.

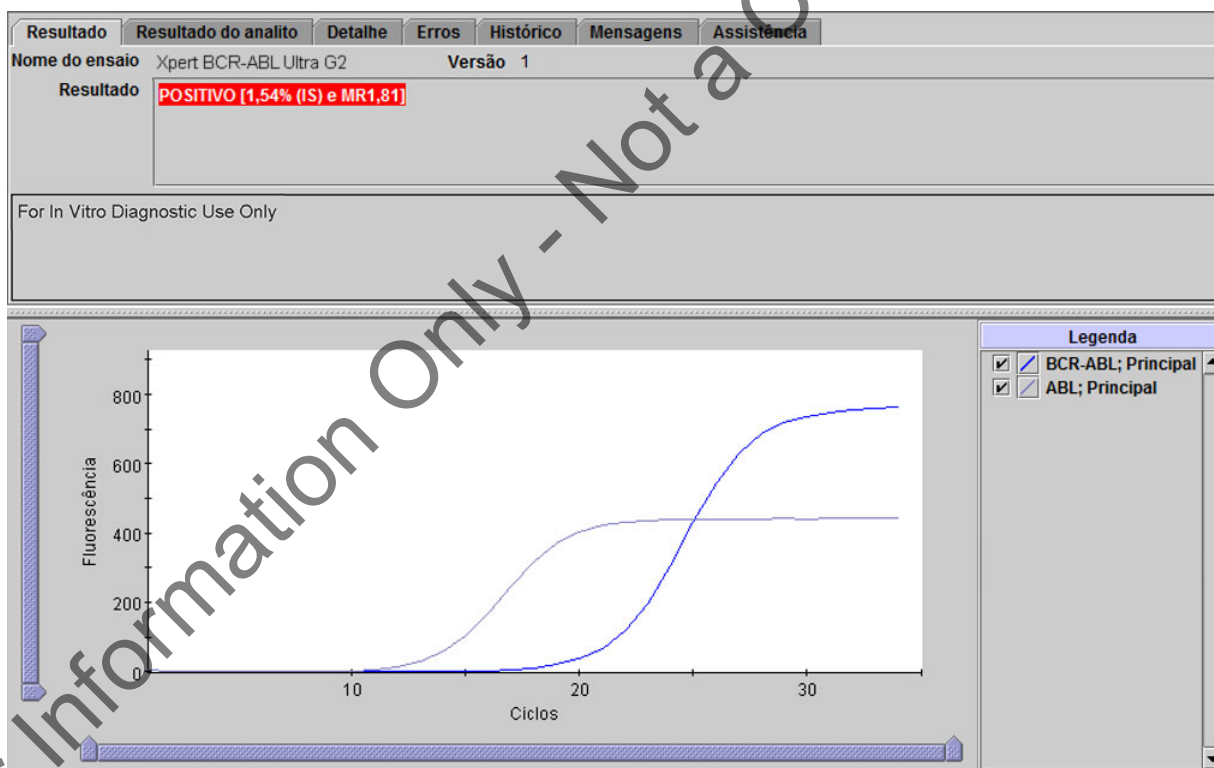


Figura 2. Janela Ver resultados do GeneXpert Dx: POSITIVO [1,54% (IS) e MR1,81] (POSITIVE [1.54% (IS) and MR1.81])

15.2 POSITIVO [Acima do LQ superior] (POSITIVE [Above upper LoQ])

BCR-ABL foi detetado num nível de $>55\%$ (*IS*) e $<MR0,26$.

Para um resultado **POSITIVO [Acima do LQ superior] (POSITIVE [Above upper LoQ])**, BCR-ABL é detetável com um BCR-ABL Ct igual ou superior a “8” e igual ou inferior ao valor de cutoff de “32” e um ABL Ct igual ou superior a “8” e igual ou inferior a “18”. O software GeneXpert calcula a % (*IS*) utilizando a seguinte equação em que o valor Delta Ct (ΔCt) é obtido subtraindo o BCR-ABL Ct ao ABL Ct:

$$\% (IS) = E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{fator de escala} (SF)$$

Nota

O fator de escala (*SF*) é um parâmetro específico do lote que está incorporado no código de barras do cartucho de teste. O valor deste fator e da Eficiência ($E_{\Delta Ct}$) específica do lote são determinados em testes de controlo de qualidade de cada lote de ensaio usando padrões secundários calibrados com base no painel internacional de referência genética da Organização Mundial da Saúde (OMS) para quantificação de transcritos BCR-ABL. Conjuntamente, os padrões secundários e os valores específicos do lote $E_{\Delta Ct}$ e *SF* calibram o resultado quantitativo do ensaio com base na *IS*. O valor $E_{\Delta Ct}$ está definido para 1,92 e o valor *SF* está definido para 1,10 para utilizar no exemplo aqui mostrado.

Exemplo: $E_{\Delta Ct}$ específico do lote = 1,92; SF = 1,10
 ABL Ct do ensaio = 13,4; BCR-ABL Ct = 14,2 ; ΔCt = -0,8
 $\% (IS) = 1,92^{(-0,8)} \times 100 \times 1,10 = 65\%$ é superior ao LoQ superior do ensaio definido para 55% (*IS*)
 $MR_{x,xx} = \log_{10}[100/\% \text{ determinada } (IS)] = \log_{10}(100) - \log_{10}(65) = 2 - \log_{10}(65) = MR0,19$ é inferior ao LoQ superior do ensaio definido para MR0,26.

Resultado: **POSITIVO [Acima do LQ superior] (POSITIVE [Above upper LoQ])**. Ver Figura 3.

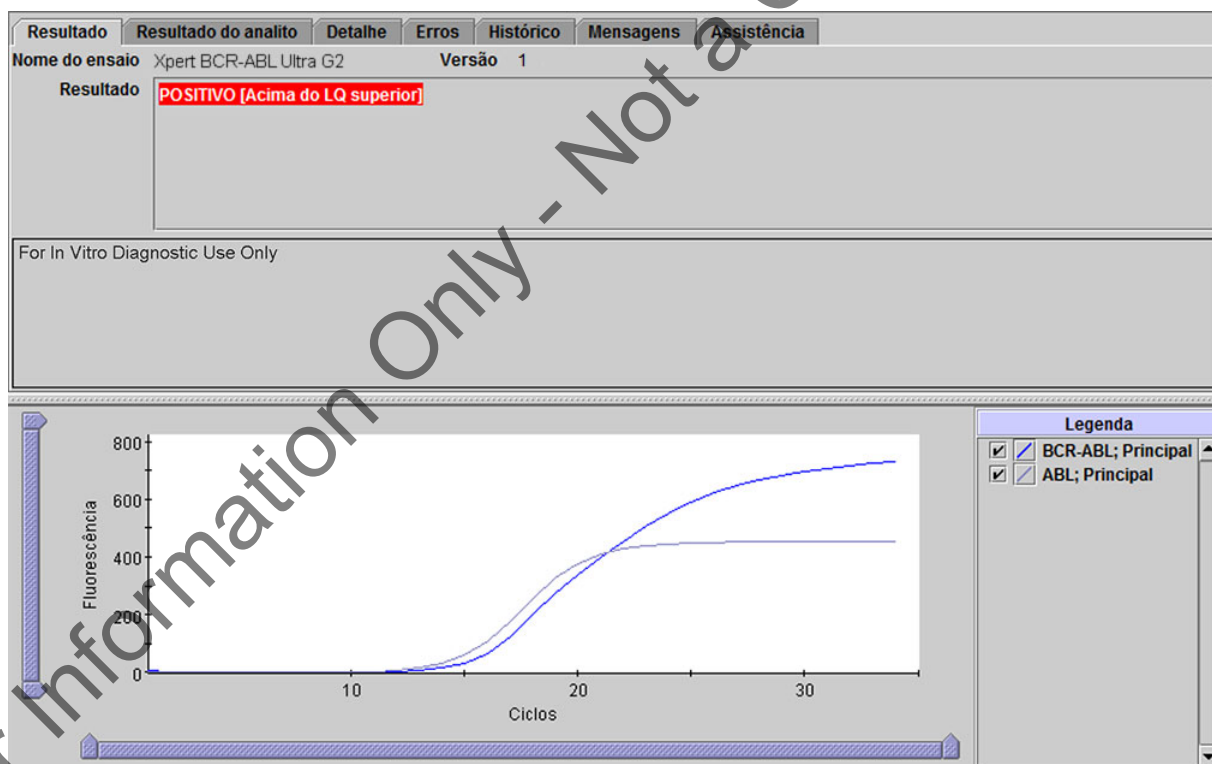


Figura 3. Janela Ver resultados do GeneXpert Dx: **POSITIVO [Acima do LQ superior] (POSITIVE [Above upper LoQ])**

15.3 POSITIVO [Abaixo de LD; >MR4,52/<0,0030% (IS)] (POSITIVE [Below LoD; MR4.52/0.0030% (IS)])

BCR-ABL foi detetado num nível de <0,0030% (IS) e >MR4,52.

Para um resultado **POSITIVO [Abaixo de LD; >MR4,52/<0,0030% (IS)] (POSITIVE [Below LoD; MR4.52/0.0030% (IS)])**, BCR-ABL é detetável com um BCR-ABL Ct igual ou superior a “8” e igual ou inferior ao valor de cutoff de “32” e um ABL Ct igual ou superior a “8” e igual ou inferior a “18”. O software GeneXpert calcula a % (IS) utilizando a seguinte equação em que o valor Delta Ct (ΔCt) é obtido subtraindo o BCR-ABL Ct ao ABL Ct:

$$\% (IS) = E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{fator de escala} (SF)$$

Nota

O fator de escala (SF) é um parâmetro específico do lote que está incorporado no código de barras do cartucho de teste. O valor deste fator e da Eficiência ($E_{\Delta Ct}$) específica do lote são determinados em testes de controlo de qualidade de cada lote de ensaio usando padrões secundários calibrados com base no painel internacional de referência genética da Organização Mundial da Saúde (OMS) para quantificação de transcritos BCR-ABL. Conjuntamente, os padrões secundários e os valores específico do lote $E_{\Delta Ct}$ e SF calibram o resultado quantitativo do ensaio para a IS. O valor $E_{\Delta Ct}$ está definido para 1,91 e o valor SF está definido para 1,14 para utilizar no exemplo aqui mostrado.

Exemplo: $E_{\Delta Ct}$ específico do lote = 1,91; SF = 1,14
 ABL Ct do ensaio = 12,5; BCR-ABL Ct = 29; ΔCt = -16,6
 $\% (IS) = 1,91^{(-16,6)} \times 100 \times 1,14 = 0,0025\%$ é inferior ao LoD definido para o ensaio em 0,0030% (IS)
 $MR_{xx,x} = \log_{10}[100/\% \text{ determinada} (IS)] = \log_{10}(100) - \log_{10}(0,0025) = 2 - \log_{10}(0,0025) = MR4,60$ é superior ao LoD definido para o ensaio em MR4,52.

Resultado: **POSITIVO [Abaixo de LD; >MR4,52/<0,0030% (IS)] (POSITIVE [Below LoD; MR4.52/0.0030% (IS)])**. Ver Figura 4.



Figura 4. Janela Ver resultados do GeneXpert Dx: POSITIVO [Abaixo de LD; >MR4,52/<0,0030% (IS)] (POSITIVE [Below LoD; MR4.52/0.003% (IS)])

15.4 NEGATIVO [Transcrito ABL suficiente] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])

Não foi detetado BCR-ABL com BCR-ABL Ct igual a “0” ou superior ao valor de cutoff de “32” e ABL Ct superior a “8” e igual ou inferior a “18”.

Quando BCR-ABL é indetetável com BCR-ABL Ct igual a “0” ou superior ao valor de cutoff de “32”, o software GeneXpert procura primeiro o ABL Ct para confirmar se o ABL Ct é igual ou superior a “8” e igual ou inferior a “18” para garantir que existe “Transcrito ABL suficiente”. Ver Secção 14., Interpretação dos resultados, Tabela 1.

Exemplo:

BCR-ABL Ct do ensaio = 0; ABL Ct = 11,3 é inferior a “18”.

Resultado: **NEGATIVO [Transcrito ABL suficiente] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])**. Ver Figura 5.



Figura 5. Janela Ver resultados do GeneXpert Dx: **NEGATIVO [Transcrito ABL suficiente] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])**

15.5 INVÁLIDO [Transcrito ABL insuficiente] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

BCR-ABL foi detetado ou não com ABL Ct superior a “18”.

Quando BCR-ABL é detetado ou não, o software GeneXpert procura primeiro o ABL Ct para confirmar se o ABL Ct é igual ou inferior a “18” para garantir que existe “Transcrito ABL suficiente”. Ver Secção 17., Guia de resolução de problemas.

Exemplo:

BCR-ABL Ct do ensaio = 0 ; ABL Ct = 24 é superior a “18”.

Resultado: **INVÁLIDO [Transcrito ABL insuficiente] (INVALID [Insufficient ABL transcript])**. Ver Figura 6.

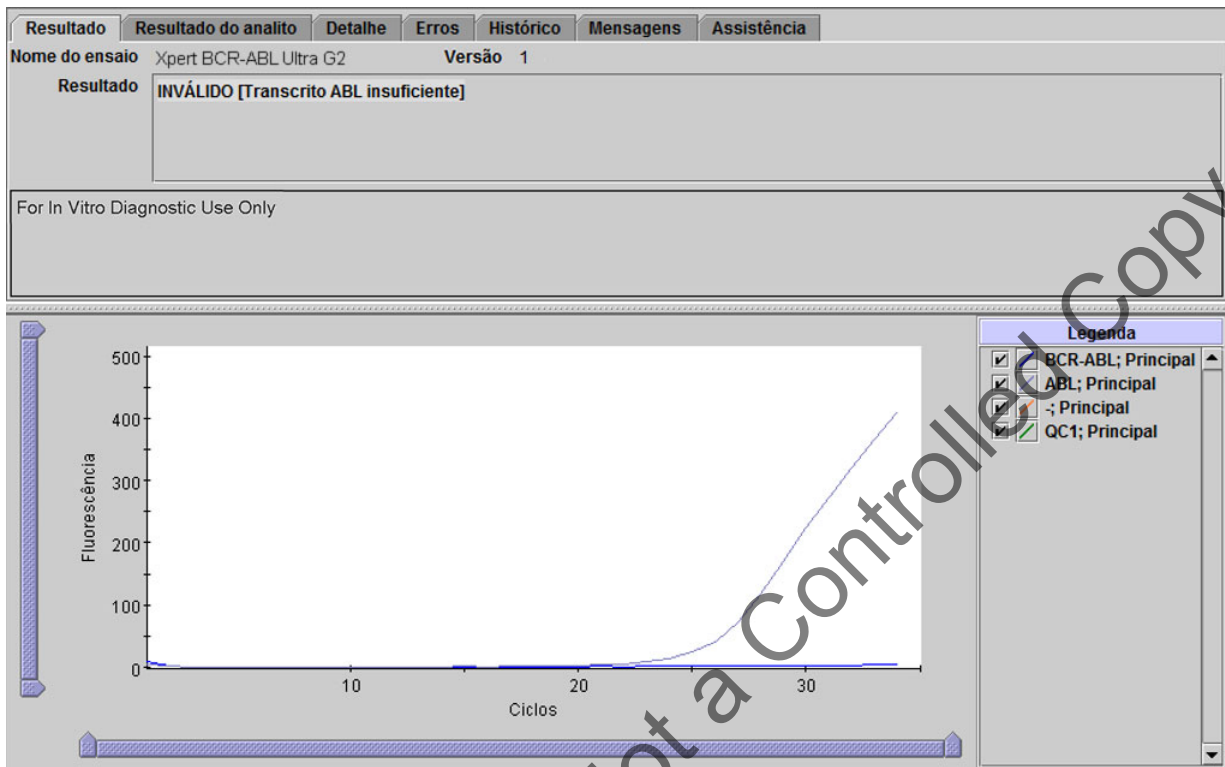


Figura 6. Janela Ver resultados do GeneXpert Dx: INVÁLIDO [Transcrito ABL insuficiente] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

15.6 ERRO (ERROR)

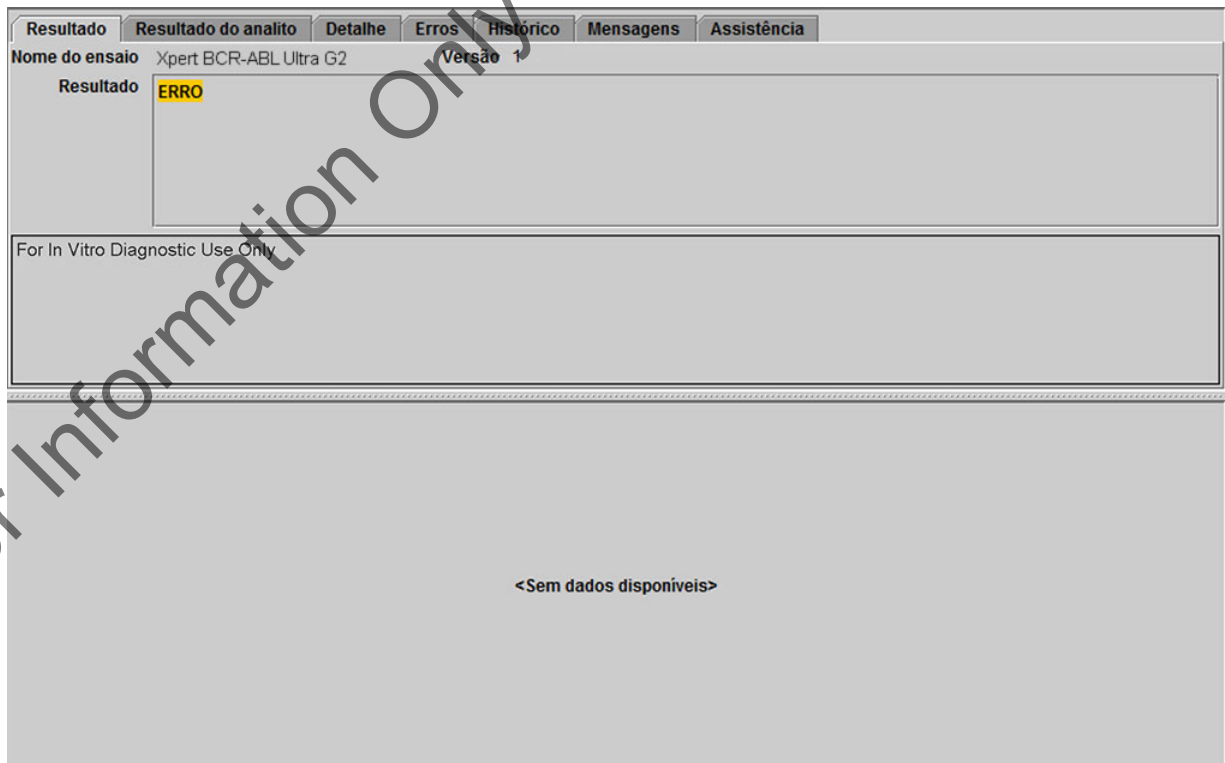


Figura 7. Janela Ver resultados do GeneXpert Dx: INVÁLIDO [Transcrito ABL insuficiente] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

16. Limitações do ensaio

- O produto destina-se apenas a diagnóstico *in vitro*.
- Cuidado: A lei federal dos EUA restringe este dispositivo a venda por ou mediante a prescrição de um profissional de saúde licenciado.
- O ensaio não se destina a utilização com calibradores externos.
- A precisão do ensaio não está demonstrada nem garantida abaixo de MR4,5.
- O ensaio não está indicado para a determinação da descontinuação do tratamento com TKIs nem para a monitorização após a descontinuação.
- O desempenho do ensaio Xpert BCR-ABL Ultra foi avaliado utilizando apenas os procedimentos detalhados neste folheto informativo. Qualquer modificação destes procedimentos pode alterar o desempenho do teste.
- Este produto foi validado para sangue colhido em tubos com EDTA.
- Não utilizar a heparina como anticoagulante, porque pode inibir a reação de PCR.
- Citrato de sódio (NaCitrato), camada leuco-plaquetária e amostras de medula óssea não foram validados.
- Podem ocorrer resultados de teste erróneos devido a incorreções na colheita, no manuseamento ou na conservação das amostras ou devido a troca de amostras. É necessário cumprir cuidadosamente as instruções deste folheto informativo para evitar resultados erróneos.
- O teste Xpert BCR-ABL Ultra destina-se apenas à deteção, e não à distinção, dos transcritos e13a2/b2a2 e e14a2/b3a2 dos transcritos BCR-ABL do gene de fusão p210. A capacidade de detetar outros transcritos de fusão não foi avaliada para além do descrito nestas instruções de utilização. O teste não deteta breakpoints minor ou micro, microdeleções ou mutações.
- O Xpert BCR-ABL Ultra não se destina a detetar a translocação e1a2 (p190), e19a2 (p230) ou outras translocações menores que possam estar presentes numa amostra de sangue periférico de um paciente com leucemia.
- O Xpert BCR-ABL Ultra não deteta os transcritos de fusão e13a2/b2a2 aberrantes em que partes da sequência adjacentes ao ponto de quebra tenham sido eliminadas.
- No caso de amostras com contagens de glóbulos brancos muito elevadas (superior a 30 milhões de células/ml), o Xpert BCR-ABL Ultra pode apresentar um resultado **INVÁLIDO (INVALID)** (Tipo 2) devido a níveis excessivos de BCR-ABL ou ABL na amostra. Ver Tabela 4, Guia de resolução de problemas para mais informações.
- Algumas amostras com níveis muito baixos de transcritos de ABL ou contagens de glóbulos brancos inferiores a 150 000 células/ml podem ser apresentadas com resultado **INVÁLIDO (INVALID)** (Tipo 1). Um resultado indeterminado não exclui a presença de níveis baixos de células leucémicas no paciente.
- O transcrito p230 de LMC com micro e19a2 breakpoint pode apresentar um resultado positivo para BCR-ABL abaixo do LoD do ensaio (0,0030% (IS)/MR4,52) quando testado a níveis de alvo elevado (>3,52 log acima do LoD).
- Mutações ou polimorfismos nas regiões de ligação do iniciador (primer) ou da sonda podem afetar a deteção de variantes novas ou desconhecidas e podem originar um resultado falso negativo.
- Os resultados de alguns pacientes com níveis muito baixos do transcrito BCR-ABL1 (ou seja, abaixo do LoD 0,0030% (IS) ou superior a MR4,52) podem ser apresentados como **NEGATIVO [Transcrito ABL suficiente] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])**. Deste modo, um resultado não detetado não exclui a presença de níveis baixos de células leucémicas no paciente.
- O ensaio está validado para a utilização no sistema GeneXpert Dx (GX-I, GX-II, GX-IV, GX-XVI) e no sistema GeneXpert Infinity (Infinity-48s e Infinity-80).

17. Guia de resolução de problemas

Tabela 4. Guia de resolução de problemas

Resultado do teste	Causas possíveis	Sugestões
INVÁLIDO (INVALID)	Tipo 1: Falha do controlo endógeno ABL: <ul style="list-style-type: none"> Má qualidade da amostra Inibição da RT-PCR Se ABL Ct > 18 e/ou endpoint < 200 	<ul style="list-style-type: none"> Verifique a qualidade da amostra (p. ex., requisitos de conservação das amostras não cumpridos, incluindo tempo e temperatura). Repita o teste com a amostra original (se disponível) ou a partir do lisado conservado e um novo cartucho de acordo com o procedimento descrito em Secção 18.1, Procedimento de repetição de teste no caso de ERRO (ERROR) ou resultado INVÁLIDO (INVALID) (Tipo 1).
	Tipo 2: Não é possível determinar o nível de transcrito BCR-ABL porque a amostra contendo BCR-ABL em excesso e/ou transcritos ABL (Ct < 8)	Repita o teste com a amostra original (se disponível) ou a partir do lisado conservado e um novo cartucho de acordo com o procedimento descrito na Secção 18.2, Procedimento de repetição de teste para ERRO (ERROR) (Código 2008) ou resultado INVÁLIDO (INVALID) (Tipo 2).
ERRO (ERROR) (Código 2008)	Pressão excedeu o limite (mensagem de erro 2008)	<ul style="list-style-type: none"> Verifique a qualidade da amostra Verifique se existe uma contagem de WBC excessivamente elevada Repita o teste com a amostra original (se disponível) ou a partir do lisado conservado e um novo cartucho de acordo com o procedimento descrito na Secção 18.2, Procedimento de repetição de teste para ERRO (ERROR) (Código 2008) ou resultado INVÁLIDO (INVALID) (Tipo 2).
ERRO (ERROR) (Código 5006, 5007, 5008 e 5009*) * Não se trata de uma lista de códigos de ERRO (ERROR) exhaustiva.	Falha de verificação da sonda	Repita o teste com a amostra original (se disponível) ou a partir do lisado conservado e um novo cartucho de acordo com o procedimento descrito em Secção 18.1, Procedimento de repetição de teste no caso de ERRO (ERROR) ou resultado INVÁLIDO (INVALID) (Tipo 1).
SEM RESULTADO (NO RESULT)	Falha de recolha de dados. Por exemplo, o operador parou um teste que estava em curso ou a alimentação elétrica falhou.	Repita o teste com a amostra original (se disponível) ou a partir do lisado conservado e um novo cartucho de acordo com o procedimento descrito em Secção 18.1, Procedimento de repetição de teste no caso de ERRO (ERROR) ou resultado INVÁLIDO (INVALID) (Tipo 1).

18. Repetição de um teste

18.1 Procedimento de repetição de teste no caso de ERRO (ERROR) ou resultado INVÁLIDO (INVALID) (Tipo 1)

Repita o teste das amostras com **ERRO (ERROR)** ou resultado **INVÁLIDO (INVALID)** por o limiar de ciclo (Ct) do ABL ter excedido o valor de cutoff máximo válido para o Ct (Ct > 18) ou o endpoint ser inferior ao limiar definido (< 200). Ver também Tabela 4, Guia de resolução de problemas.

1. Se existir um *suficiente* volume de amostra de sangue, repita o teste a partir do tubo de colheita de amostras de sangue original de acordo com o procedimento descrito na Secção 11.2, Preparação da amostra.
-OU-
2. Se o volume da amostra for *insuficiente*, é possível repetir o teste com o lisado conservado da Secção 11.2, Preparação da amostra, Passo 12.
 - A. Se o lisado restante de Secção 11.2, Preparação da amostra, Passo 12 estiver congelado, descongele à temperatura ambiente antes de utilizar.
 - B. Certifique-se de que o lisado está bem misturado agitando continuamente a amostra com um agitador de vórtice na definição máxima durante 10 segundos e deixando repousar durante 3 minutos para assentar as bolhas. Vá para o Passo 3.
3. Transfira 1 ml do lisado preparado para um novo tubo cónico de 50 ml.
4. Adicione 1,5 ml do reagente de lise (LY) ao novo tubo cónico que contém o lisado.
5. Agite a amostra em vórtex continuamente à velocidade máxima durante 10 segundos.
6. Incube à temperatura ambiente durante 10 minutos.
7. Ao mesmo tubo cónico adicione 2 ml de etanol absoluto grau reagente (não fornecido).
8. Agite a amostra em vórtex continuamente à velocidade máxima durante 10 segundos.
9. Abra o cartucho levantando a tampa e transfira todo o conteúdo da ampola do reagente de lavagem (1) para a câmara do reagente de lavagem (com a abertura pequena). Ver Figura 1.
10. Pipete a totalidade da amostra preparada para a câmara de amostra (abertura grande). Ver Figura 1.
11. Feche a tampa do cartucho. Inicie o teste (ver Secção 11.5, Iniciar o teste).

18.2 Procedimento de repetição de teste para ERRO (ERROR) (Código 2008) ou resultado INVÁLIDO (INVALID) (Tipo 2)

Repita o teste das amostras com níveis de transcrito BCR-ABL e/ou ABL abaixo do valor de cutoff mínimo válido para Ct (Ct < 8) e/ou quando o limite de pressão é excedido. Ver também Tabela 4, Guia de resolução de problemas.

1. No fundo de um tubo cónico de 50 ml novo adicione 100 µl de PK (Proteinase K).
2. Se a amostra de sangue disponível for *suficiente*, repita o teste a partir do tubo de colheita da amostra de sangue original. Certifique-se de que a amostra de sangue é bem misturada, invertendo 8 vezes o tubo de colheita de sangue imediatamente antes da pipetagem. Vá para o Passo 3.
-OU-
Se o volume da amostra for *insuficiente*, é possível repetir o teste com o lisado conservado da Secção 11.2, Preparação da amostra, Passo 12.
 - A. Se o lisado restante de Secção 11.2, Preparação da amostra, Passo 12 estiver congelado, descongele à temperatura ambiente antes de utilizar. Se for utilizado lisado refrigerado, deixe atingir a temperatura ambiente antes de utilizar.
 - B. Certifique-se de que o lisado está bem misturado agitando continuamente a amostra com um agitador de vórtice na definição máxima durante 10 segundos e deixando repousar durante 3 minutos para assentar as bolhas. Vá para o Passo 3.
3. Ao tubo já contendo proteinase K, adicione 50 µl da amostras de sangue, se disponível, ou 80 µl de lisado restante do Secção 11.2, Preparação da amostra, Passo 12.
 - A. Agite a amostra em vórtex continuamente à velocidade máxima durante 3 segundos.
 - B. Incube à temperatura ambiente durante 1 minuto.
4. Adicione 2,5 ml do reagente de lise (LY) ao novo tubo cónico que contém o lisado.
5. Agite a amostra em vórtex continuamente à velocidade máxima durante 10 segundos.
6. Incube à temperatura ambiente durante 10 minutos.

7. Ao mesmo tubo cónico adicione 2 ml de etanol absoluto grau reagente (não fornecido).
8. Agite a amostra em vórtex continuamente à velocidade máxima durante 10 segundos.
9. Abra o cartucho levantando a tampa e transfira todo o conteúdo da ampola do reagente de lavagem (1) para a câmara do reagente de lavagem (com a abertura pequena). Ver Figura 1.
10. Pipete a totalidade da amostra preparada para a câmara de amostra (abertura grande). Ver Figura 1.
11. Feche a tampa do cartucho. Inicie o teste (ver Secção 11.5, Iniciar o teste).

19. Valores esperados

O intervalo do Xpert BCR-ABL Ultra abrange pontos essenciais da decisão clínica para a monitorização da LMC (desde MR 1 a 4,5)⁵ com a deteção quantitativa de mARN de BCR-ABL (transcritos e13a2/b2a2 ou e14a2/b3a2) e de mARN do controlo endógeno ABL. Os valores esperados estão no intervalo do Xpert BCR-ABL Ultra de 0,0030 a 55% (IS) (MR4,52 a MR0,26).

20. Características do desempenho

20.1 Desempenho clínico

O desempenho clínico do ensaio Xpert BCR-ABL Ultra foi avaliado em quatro instituições nos EUA no âmbito de um estudo clínico multicêntrico. Outras três instituições adicionais serviram apenas como centros de colheita de amostras. O estudo foi realizado utilizando amostras de sangue total frescas colhidas prospetivamente em EDTA de pacientes com LMC em qualquer estadio da doença, após o diagnóstico inicial, com ou sem exposição prévia a terapia com inibidor da tirosina quinase ou outro tratamento para a LMC. Além disso, o estudo incluiu amostras restantes, conservadas como lisados congelados que foram preparados a partir das amostras de sangue total em EDTA provenientes da mesma população de pacientes. O desempenho do teste Xpert BCR-ABL Ultra foi comparado com um ensaio molecular aprovado pela FDA que deteta e quantifica os transcritos de ARNm para os tipos de translocação p210 (e13a2/b2a2 ou e14a2/b3a2) e utiliza o ABL como transcrito de ARNm como controlo endógeno.

No total, foram inscritas no estudo 266 amostras elegíveis, das quais 57 foram excluídas devido à utilização de um procedimento obsoleto como método de extração (27), o participante não realizou a colheita de sangue (8), atraso na expedição ou teste (6), volume insuficiente para o teste (6), falha do teste comparador (6) ou utilização do ficheiro de definição do ensaio incorreto no Xpert BCR-ABL Ultra (4), resultando num total de 209 amostras testadas.

Das 209 amostras, 97,1% (203/209) dos resultados do Xpert BCR-ABL Ultra foram bem sucedidos na primeira tentativa, com uma taxa de indeterminados de 2,9% (6/209) e 99,5% (208/209) tiveram êxito após a repetição do teste, com uma taxa de indeterminados de 0,5% (1/209).

Das 208 amostras disponíveis para análise, 150 (72,1%) eram amostras congeladas e 58 (27,9%) eram amostras frescas colhidas prospetivamente, para as quais existia informação demográfica. Das amostras frescas, 24 (41,4%) foram colhidas de mulheres e 34 (58,6%) de homens. A idade média dos participantes dos quais provinham as amostras frescas era de 60,5 anos (intervalo 28-85 anos).

Dos 208 resultados disponíveis para análise, 147 tinham resultados no intervalo quantitativo notificável em ambos os ensaios [0,0030% - 55% (IS)/MR4,52 - MR0,26 no Xpert BCR-ABL Ultra e 0,0020% - 50% (IS)/MR4,72 - MR0,30 no ensaio comparador]: 117 dos quais derivaram de lisados restantes congelados e 30 de amostras frescas colhidas prospetivamente. O desempenho do teste Xpert BCR-ABL Ultra versus o ensaio comparador foi avaliado utilizando uma regressão de Deming para determinar o declive e a ordenada. A Figura 8 mostra a regressão de Deming e a análise de regressão linear dos 147 resultados do ensaio (valores MR).

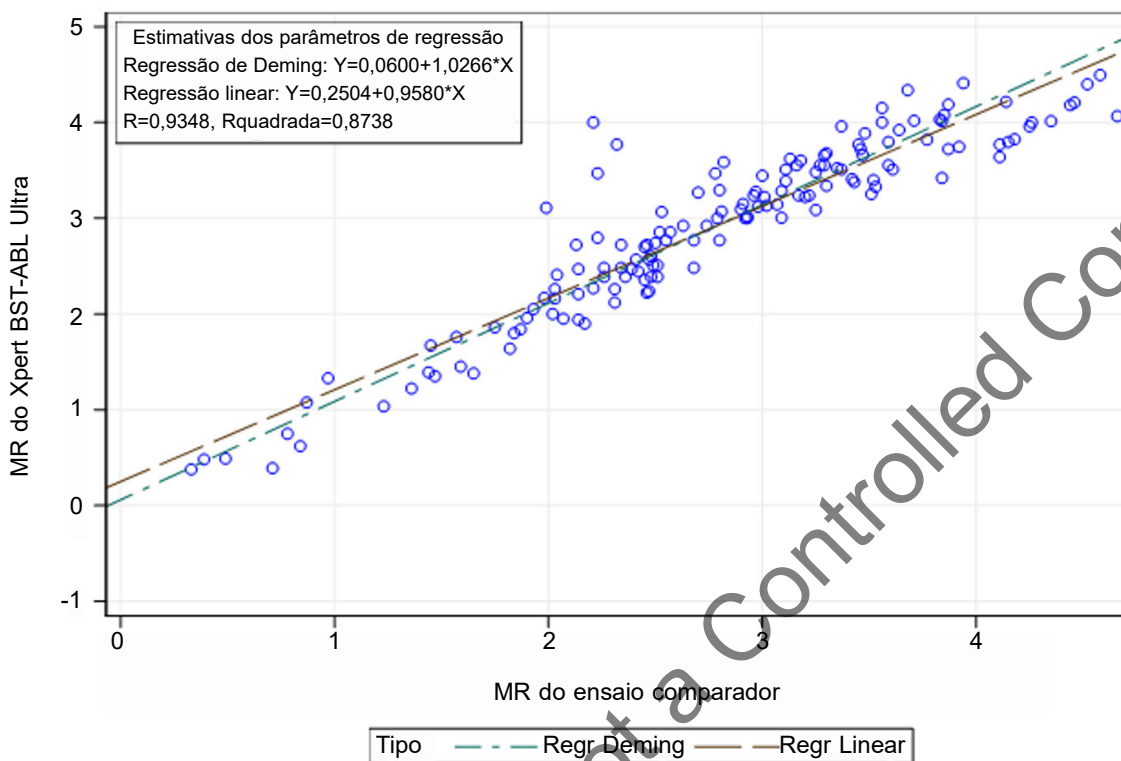


Figura 8. Análises de regressão de Deming e regressão linear

O declive e a ordenada da regressão de Deming foi de 1,0266 e 0,0600 respetivamente. Com base nestes resultados, o desvio previsto na MMR (MR3) foi calculado como MR0,1244 (intervalo de confiança de 95%: 0,0969 – 0,1519).

Uma análise de diferença Bland-Altman também foi efetuada utilizando os 147 resultados quantitativos no intervalo notificável do teste Xpert BCR-ABL Ultra e do ensaio comparador. O gráfico Bland-Altman (ver Figura 9) mostra o 2DP superior e inferior da diferença média observada. A linha de tendência do desvio ao longo do intervalo MR também é mostrada.

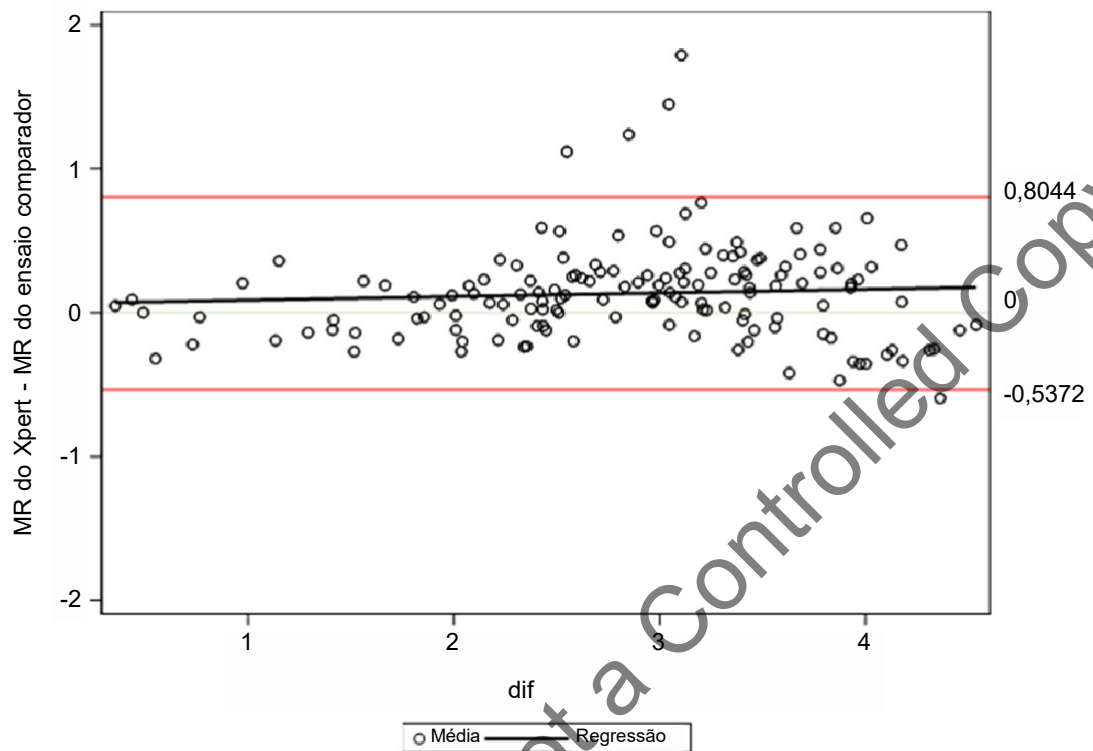


Figura 9. Análise de diferença Bland-Altman entre MR de BCR-ABL do teste Xpert BCR-ABL Ultra vs MR do ensaio comparador

A diferença média (desvio) foi calculada como 0,1336 um DP de 0,3354. A maioria (96,6%, 142/147) dos resultados estavam dentro do intervalo 2DP (entre -0,5372 e 0,8044).

21. Desempenho analítico

21.1 Rastreabilidade para o painel da OMS

A rastreabilidade para o 1.º painel de referência genética internacional da Organização Mundial de Saúde (OMS) para quantificação de translocação de BCR-ABL por RQ-PCR (código NIBSC: 09/138) foi demonstrada medindo o painel de referência da OMS com 3 lotes do teste Xpert BCR-ABL Ultra e comparando os valores medidos com os valores publicados nas instruções de utilização do painel de referência.¹⁹ Cada um dos 4 membros do painel de referência foi testado com um mínimo de 10 réplicas por lote do kit de ensaio. Os valores MR para cada nível do painel principal da OMS foram calculados por regressão a cada lote do teste Xpert BCR-ABL Ultra (ou seja, os membros do painel da OMS foram tratados como amostras clínicas e ajustados ao modelo de regressão linear da curva padrão do ensaio). Além disso, os valores MR medidos foram comparados com os valores MR publicados através de uma análise de regressão adicional para determinar os valores de declive e ordenada. O declive da linha foi próximo da unidade (0,96 a 1,1) e a ordenada foi calculada como próxima de 0 (-0,03 a -0,06).

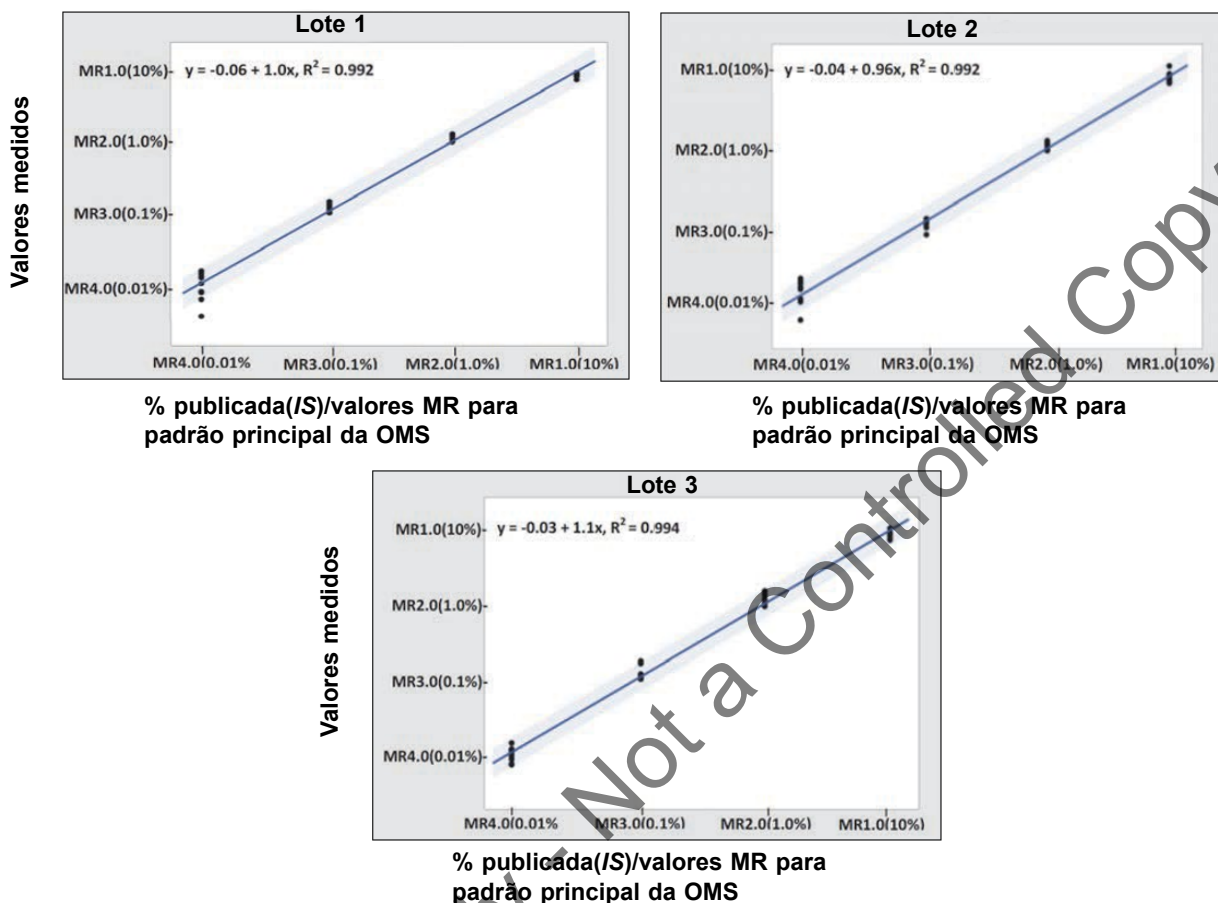


Figura 10. Valores medidos vs publicados para o painel de referência principal da OMS, inter-lote.

Os valores MR gerados pelo kit Xpert BCR-ABL Ultra (eixo y) são traçados em comparação com os valores MR publicados nas instruções de utilização do painel de referência principal da OMS (eixo x). Os três lotes são representados por pontos de dados (pretos). As análises de regressão e os intervalos de confiança baseiam-se nos dados para cada lote separadamente.

21.2 Linearidade/Intervalo dinâmico

A linearidade foi avaliada de forma independente para cada um dos dois breakpoints major, e13a2/b2a2 e e14a2/b3a2, utilizando amostras clínicas com LMC específicas para um nível elevado do breakpoint e13a2/b2a2 ou e14a2/b3a2. O lisado de cada amostra com LMC com nível elevado de transcrito de BCR-ABL foi diluído num lisado de fundo preparado a partir de uma amostra clínica negativa para LMC a intervalos-alvo de ~50% (IS)/MR0,30 a 0,000625% (IS)/MR5,20. Os membros do painel, incluindo o nível negativo, foram testados em dois lotes do kit de ensaio em réplicas de 4 por lote do kit.

Os testes e as análises estatísticas foram realizadas de acordo com a diretriz CLSI EP06-A. As análises de regressão linear foram realizadas para polinômios de primeira, segunda e terceira ordem. Os resultados de cada breakpoint foram considerados lineares se os coeficientes de regressão polinomial eram insignificantes (valores $p > 0,05$). As curvas de regressão linear para ambos os transcritos são mostradas na Figura 11 e Figura 12 em baixo.

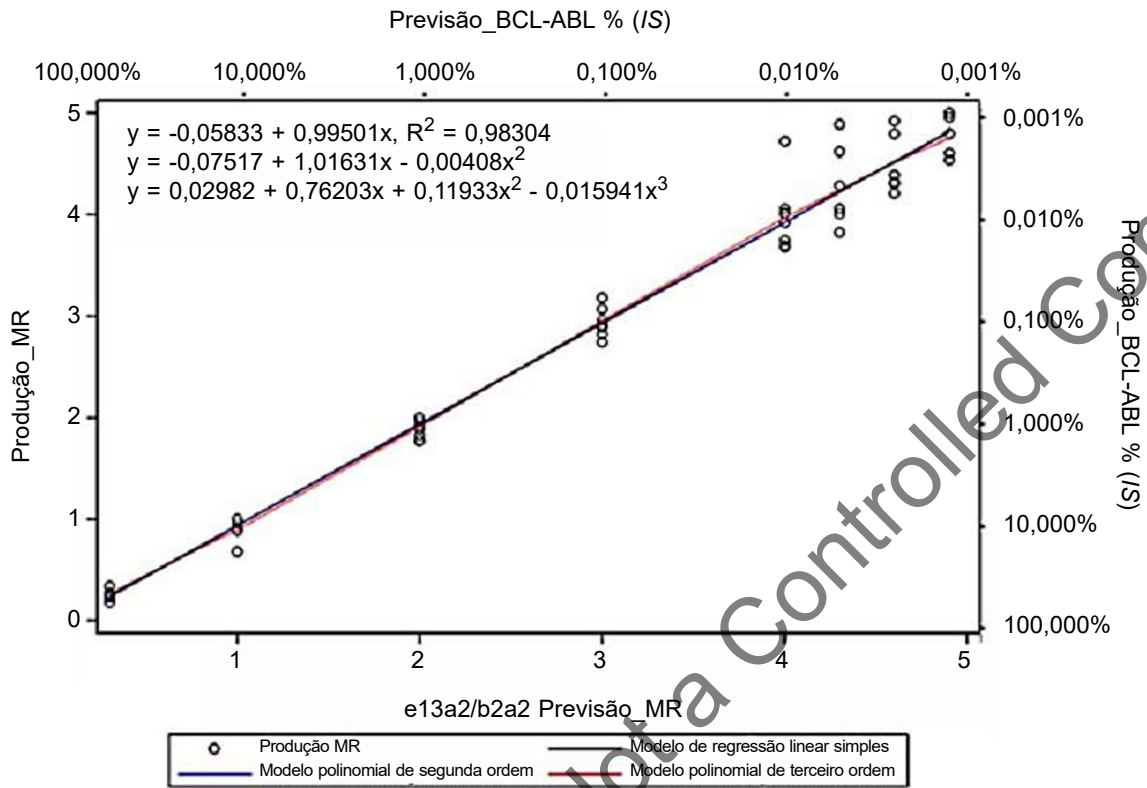


Figura 11. Curvas de regressão linear para transcrito de breakpoint e13a2/b2a2

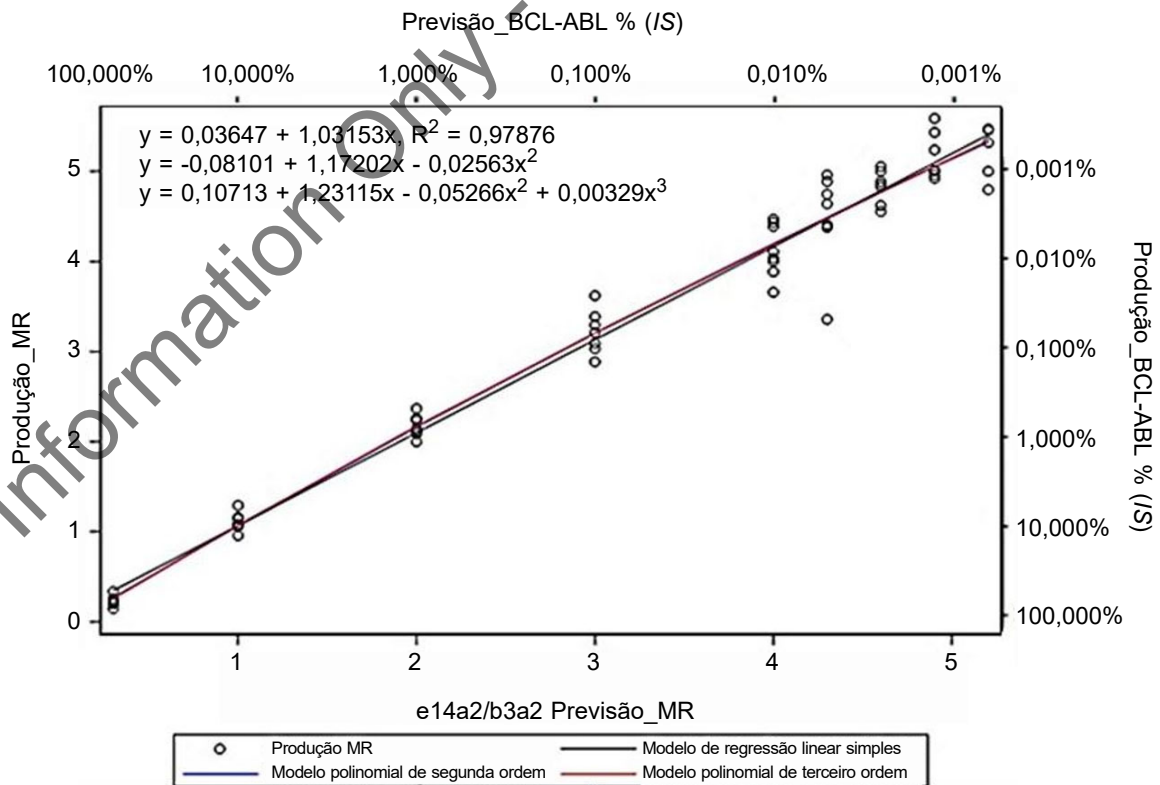


Figura 12. Curvas de regressão linear para transcrito de breakpoint e14a2/b3a2

Os valores estimados da ordenada, declives e R^2 da regressão no modelo linear são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Coeficientes de regressão do modelo linear

Breakpoint	Ordenada	Declive	R^2
e13a2/b2a2	-0,05833	0,99501	0,98304
e14a2/b3a2	0,03647	1,03153	0,9788

No conjunto, os dados fundamentam uma observação de linearidade de, pelo menos, 55% (IS)/MR 2,26 a 0,0019% (IS)/MR 4,75 com um DP máximo de 0,26. O intervalo notificável vai desde os limites de linearidade a 55% (IS)/MR0,26 ao LoQ a 0,0030% (IS)/MR4,52.

21.3 Sensibilidade analítica (limite de deteção, limite de quantificação, limite do branco)

O limite de deteção (LoD) foi calculado para os breakpoints e13a2/b2a2 e e14a2/b3a2 testando diluições em série de amostras positivas altas para LMC [$>10\%$ (IS)/MR1] e amostras positivas baixas para LMC [$<0,1\%$ (IS)/MR3]. Os dados de cada breakpoint nas diluições e amostras foram compilados separadamente e o LoD foi calculado utilizando a análise de regressão probit. A análise resultante produziu um LoD estimado de 0,0035% (IS)/MR4,45 para o breakpoint e13a2/b2a2 e de 0,0030% (IS)/MR4,52 para o breakpoint e14a2/b3a2.

O LoD foi verificado adaptando o método não paramétrico descrito no documento de orientação do CLSI, EP17-A2 (Tabela 6). Duas amostras positivas para LMC diferentes representando cada breakpoint foram diluídas a um nível-alvo de 0,0030% (IS)/MR4,52. Para o e13a2/b2a2, 94 réplicas foram testadas por 2 operadores com 4 lotes do kit de teste durante 4 dias. Para o e14a2/b3a2, 101 réplicas foram testadas por 2 operadores com 4 lotes do kit de teste durante 7 dias.

Tabela 6. Limite de deteção verificado em % (IS)/MR

Breakpoint	Positivos/Réplicas	% de positivos	% mediana (IS)/MR
e13a2/b2a2	90/94	95,74%	0,0030% (IS)/MR4,52
e14a2/b3a2	97/101	96,04%	0,0029% (IS)/MR4,55

Dado que o teste Xpert BCR-ABL Ultra não distingue entre os dois breakpoints, e13a2/b2a2 e e14a2/b3a2, o mais elevado dos dois é considerado como LoD do ensaio. Consequentemente, o LoD global do Xpert BCR-ABL Ultra para e13a2/b2a2 e e14a2/b3a2 é de 0,0030% (IS)/MR4,52.

O limite de quantificação (LoQ) foi calculado com os dados obtidos nos estudos do LoD. A média e o desvio-padrão para os valores de % (IS) e de MR foram calculados para réplicas a níveis iguais ao LoD, 0,0030% (IS)/MR4,52, ou superiores com a positividade igual ou superior a 95%. O LoQ do ensaio é restringido pelo LoD do ensaio; consequentemente, o LoQ foi determinado como sendo igual ao LoD, 0,0030% (IS)/MR 4,52. Os resultados também foram avaliados em comparação com os critérios de aceitação para o desvio-padrão (DP) $\leq 0,36$. O desvio-padrão de MR para e13a2/b2a2 (intervalo de DP observado MR0,27-MR0,34) e para e14a2/b3a2 (intervalo de DP observado MR0,29-MR0,31) estava dentro dos critérios de aceitação.

O limite do branco (LoB) foi determinado com 50 amostras de sangue provenientes de doadores saudáveis, presumivelmente sem LMC, colhidas em tubos com EDTA. Não foram observados valores de BCR-ABL mensuráveis para quaisquer testes. Consequentemente, o LoB global foi determinado como 0,00% (IS).

21.4 Especificidade analítica

A especificidade analítica e clínica do Xpert BCR-ABL Ultra foi avaliada quanto a exclusividade analisando amostras de sangue total colhidas em EDTA provenientes de cinquenta (50) doadores saudáveis (sem LMC) e vinte (20) amostras leucémicas (LMA/LLA). A especificidade do breakpoint foi determinada testando amostras de sangue de doadores saudáveis, normais, colhidas em EDTA, enriquecidas com cinco (5) linhas celulares de leucemia diferentes representando 3 tipos diferentes de leucemia (LMC, LLA e LPA) e 5 breakpoints de doença: K562 (CML/e14a2/b3a2) e BV173 (LMC/e13a2/b2a2) serviram como controlos positivos; SUP-B15 (ALL/e1a2), AR230 (LMC/e19a2) e NB4 (LMC/PML-RARA) foram avaliados quanto à especificidade.

Não foi detetado qualquer sinal de BCR-ABL pelo Xpert BCR-ABL Ultra em todas as amostras saudáveis sem LMC ou amostras leucémicas LMA/LLA avaliadas neste estudo.

Entre as linhas celulares de leucemia testadas, as linhas celulares de LMC (K562 e BV173) com breakpoints major p210 produziram os resultados positivos esperados. A linha celular de LMC (AR230) com o breakpoint p230 e19a2 apresentado como **POSITIVO [Abaixo de LD; $>MR4,52/<0,0030\%$ (IS)] (POSITIVE [Below LoD; $MR4.52/0.0030\%$ (IS)])** para 1 de 4 réplicas testadas ao nível de 10% (IS)/MR1,00 com base no número de células K562. O resultado positivo para a linha celular AR230 para o nível-alvo de 3,52 log acima do LoD do ensaio e não foi observado aos níveis inferiores de 1% (IS)/MR2,00 e 0,1% (IS)/MR3,00.

O Xpert BCR-ABL Ultra é específico para o transcrito BCR-ABL do gene de fusão p210 associado à LMC e tem uma especificidade analítica de 100% para amostras de sangue sem LMC em EDTA.

21.5 Contaminação por transferência (carry-over)

Realizou-se um estudo para demonstrar que os cartuchos GeneXpert autônomos de utilização única impedem a contaminação por transferência (carry-over) em cartuchos executados sucessivamente no mesmo módulo. Para demonstrá-lo, foram processadas no mesmo módulo GeneXpert amostras negativas após amostras positivas muito elevadas. Este estudo consistiu no processamento de uma amostra **NEGATIVA (NEGATIVE)** normal em EDTA (sangue negativo para LMC) no mesmo módulo GeneXpert imediatamente após uma amostra **POSITIVA (POSITIVE)** alta (sangue positivo para LMC simulado) com $4,5 \times 10^5$ células/ml de células K562 enriquecidas em sangue negativo para LMC para produzir ~10% (IS)/MR1,00. Esta sequência de testes foi repetida cinco vezes em cada um dos quatro módulos GeneXpert. As vinte amostras positivas para BCR-ABL foram corretamente apresentadas como **POSITIVO [#.##% (IS) e MR#,##] (POSITIVE [#.##% (IS) and MR#,##])**, enquanto as vinte amostras negativas para BCR-ABL foram corretamente apresentadas como **NEGATIVO [Transcrito ABL suficiente] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])**.

21.6 Substâncias potencialmente interferentes

Este estudo avaliou cinco substâncias que podem estar presentes em amostras de sangue total em EDTA com o potencial para interferir com o desempenho do teste Xpert BCR-ABL Ultra. Os compostos e níveis testados (ver Tabela 7) basearam-se nas orientações do documento EP07-A2 do CLSI. As substâncias interferentes foram testadas no fundo de amostras clínicas de sangue total com LMC em EDTA representando três níveis com cinco amostras por nível: >1% (IS)/MR2, 0,1-1% (IS)/MR3-MR2 e <0,1% (IS)/MR3. Os controlos do teste consistiam em amostras clínicas de sangue total com LMC em EDTA ao respetivo nível de transcrito BCR-ABL sem a substância interferente. Cada amostra com LMC foi testada na ausência e presença das cinco substâncias interferentes individuais a 4 réplicas por condição.

Uma substância foi considerada como não interferente se, na sua presença, a proporção média % (IS)/MR observada esteve dentro do intervalo de diferença 3 vezes superior em comparação com o controlo.

Não foram observados efeitos inibitórios clinicamente significativos no Xpert BCR-ABL Ultra com quaisquer substâncias interferentes avaliadas neste estudo. Embora se tenha observado variabilidade e diferenças estatisticamente significativas (valor $p < 0,05$) em algumas condições testadas, as proporções notificadas de % (IS)/MR para as condições de teste e controlo estavam dentro do intervalo aceitável 3 vezes superior.

Tabela 7. Substâncias potencialmente interferentes testadas utilizando o Xpert BCR-ABL Ultra

Substâncias interferentes	Concentração testada
Bilirrubina não conjugada	20 mg/dl
Colesterol, total	500 mg/dl
Triglicéridos, total (Lípidos)	1800 mg/dl
Heparina	3500 U/l
EDTA (colheita breve)	750 mg/dl (5X)

22. Precisão e reprodutibilidade

A precisão e reprodutibilidade do teste Xpert BCR-ABL Ultra foi avaliada num estudo multicêntrico em conformidade com documento EP05-A3, “Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline”, e EP15-A3, “User Verification of Performance for Precision and Trueness, Approved Guideline” do CLSI.

Foi preparado um painel de onze amostras, que incluía as seguintes: uma amostra negativa para BCR-ABL, duas amostras próximas do limite de deteção (LoD) e oito amostras nos níveis de resposta molecular (MR) 1-4, utilizando os dois alvos detetados pelo teste Xpert BCR-ABL Ultra: e13a2/b2a2 e e14a2/b3a2. O painel de amostras foi produzido diluindo um lisado em bruto de amostras %BCR-ABL/ABL altas de pacientes com LMC em amostras agrupadas de sangue total colhidas de doadores saudáveis para obter o nível pretendido.

A Tabela 8 mostra as onze amostras incluídas neste estudo.

Tabela 8. Painel de reprodutibilidade do Xpert BCR-ABL Ultra

N.º amostra	Descrição	% (IS)
1	MR1,0 e13a2/b2a2	BCR-ABL a ~10% (IS)
2	MR1,0 e14a2/b3a2	BCR-ABL a ~10% (IS)
3	MR2,0 e13a2/b2a2	BCR-ABL a ~1% (IS)
4	MR2,0 e14a2/b3a2	BCR-ABL a ~1% (IS)

Tabela 8. Painel de reprodutibilidade do Xpert BCR-ABL Ultra (continuação)

N.º amostra	Descrição	% (IS)
5	MR3,0 e13a2/b2a2	BCR-ABL a ~0,1% (IS)
6	MR3,0 e14a2/b3a2	BCR-ABL a ~0,1% (IS)
7	MR4,0 e13a2/b2a2	BCR-ABL a ~0,01% (IS)
8	MR4,0 e14a2/b3a2	BCR-ABL a ~0,01% (IS)
9	Próximo do LoD e13a2/b2a2	BCR-ABL a ~0,005% (IS)
10	Próximo do LoD e14a2/b3a2	BCR-ABL a ~0,005% (IS)
11	Negativo	Não foi detetado BCR-ABL

Cada um dos onze membros do painel foi testado em duplicado, duas vezes por dia, em quatro dias diferentes, por cada um dos três operadores diferentes, em três centros diferentes. Foram utilizados três lotes de kits Xpert BCR ABL Ultra e cada operador executou os testes com um lote (3 centros x 3 lotes x 1 operador/lote x 4 dias x 2 execuções/operador x 2 réplicas/execução = 144 réplicas/membro do painel).

Os resultados quantitativos foram analisados através de análise de variância (ANOVA) e os principais componentes da variância foram identificados.

A análise ANOVA para cada membro do painel está apresentada na Tabela 9.

Tabela 9. Estudo de reprodutibilidade: resultados da análise de variância

Amostra	N	Média (MR)	DP centro/instrumento	DP operador/lote	DP dia	DP na execução	DP total ^a
Alvo MR1,0 e13a2/b2a2	144	0,96	0	0,05	0,01	0,06	0,08
Alvo MR1,0 e14a2/b3a2	144	0,99	0	0,06	0	0,08	0,1
Alvo MR2,0 e13a2/b2a2	143	2,04	0	0,06	0,02	0,10	0,11
Alvo MR2,0 e14a2/b3a2	144	2,09	0,03	0,07	0,02	0,10	0,13
Alvo MR3,0 e13a2/b2a2	144	2,89	0,06	0,04	0,03	0,10	0,12
Alvo MR3,0 e14a2/b3a2	144	3,12	0,06	0,08	0	0,11	0,15
Alvo MR4,0 e13a2/b2a2	143 ^b	3,67	0,03	0,02	0	0,15	0,15
Alvo MR4,0 e14a2/b3a2	144	3,91	0,05	0,08	0,04	0,14	0,17
Alvo MR>4,0 e13a2/b2a2	140 ^c	4,36	0,04	0,04	0	0,33	0,33
Alvo MR>4,0 e14a2/b3a2	143 ^d	4,22	0,03	0,08	0	0,17	0,19

- O teste Xpert BCR-ABL Ultra realizado nos sistemas GeneXpert Dx e GeneXpert Infinity integra a purificação de amostras e amplificação de ácidos nucleicos. A variabilidade global do teste observada neste estudo (expressa como DP total) inclui uma variabilidade gerada pela preparação da amostra no equipamento e os passos RT-qPCR.
- Uma réplica que cumpria os requisitos de valor atípico (outlier) no nível 99% em conformidade com no EP15-A3 do CLSI foi removida da análise.
- 4 amostras dos 144 resultados do teste apresentaram um valor NEGATIVO (NEGATIVE).
- 1 amostra dos 144 resultados do teste apresentou um valor NEGATIVO (NEGATIVE).

O desvio-padrão total observado para as amostras no nível MR1, MR2 e MR3 foi de $\leq 0,15$. O desvio-padrão total observado máximo para as amostras próximas do LoD e MR4 foi de 0,33.

23. Referências

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer Statistics 2008; CA Cancer J Clin. 2008;58:71-96.
2. NIH/NCI – Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER). Cancer Stat Facts: Chronic Myeloid Leukemia (CML). Accessed December 21, 2018. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/cmly.html>
3. Thompson PA, Kantarjian HM, Cortes JE. Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in 2015. Mayo Clin Proc. 2015;90(10):1440-1454.
4. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Blood. 2005;105(7):2640-2653.
5. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood. 2006;108(1):28-37.
6. NCCN. Clinical Practice Guidelines in Oncology; Chronic Myelogenous Leukemia (Access Version 1, 2019).
7. White H, Matejtschuk P, Rigsby P, et al. Establishment of the first World Organization International Generic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. Blood. 2010; 116:e111-e117.
8. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2003;17:2318-2357.
9. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) - a Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2003;17:2474-2486.
10. van der Velden VH, Boeckx N, Gonzalez M, et al. Differential stability of control gene and fusion gene transcripts over time may hamper accurate quantification of minimal residual disease—a study within the Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2004;18:884-886.
11. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia. 2003;17:1013-1034.
12. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical laboratories (refer to latest edition). <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
14. World Health Organization. Safe management of wastes from health-care activities. Bulletin of the World Health Organization (refer to latest edition).
15. REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on the classification, labeling and packaging of substances and mixtures amending and repealing, List of Precautionary Statements, Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC (amending Regulation (EC) No 1907/2007).
16. Occupational Safety and Health Standards, Hazard Communication, Toxic and Hazard Substances (March 26, 2012) (29 C.F.R., pt. 1910, subpt. Z).
17. Baccarani M, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia. Blood. 2013 Jun; 122(6):872-884.
18. Hochhaus A, et al. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow up. Annals of Oncology. 2017 May; 28(4):iv41-iv51.
19. WHO International Standard 1st WHO International Genetic Reference Panel for the quantitation of BCR-ABL translocation NIBSC code: 09/138. Instructions for use. (Version 4.0., Dated 13/12/2012).

24. Localização das sedes da Cepheid

Sede corporativa

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
Estados Unidos da América
Telefone: + 1 408 541 4191
Fax: + 1 408 541 4192
www.cepheid.com

Sede europeia

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
França
Telefone: + 33 563 825 300
Fax: + 33 563 825 301
www.cepheidinternational.com

25. Assistência Técnica

Antes de contactar a Assistência técnica da Cepheid, reúna as seguintes informações:

- Nome do produto
- Número de lote
- Número de série do instrumento
- Mensagens de erro (se houver alguma)
- Versão do software e, caso se aplique, número da etiqueta de serviço (Service Tag) do computador

















Informações de contacto

Estados Unidos da América
Telefone: + 1 888 838 3222
E-mail: techsupport@cepheid.com

França
Telefone: + 33 563 825 319
E-mail: support@cepheideurope.com

As informações de contacto para outros escritórios de assistência técnica da Cepheid estão disponíveis no nosso website: www.cepheid.com/en/CustomerSupport.

26. Tabela de símbolos

Símbolo	Significado
	Número de catálogo
	Apenas para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código do lote
	Não reutilizar
	Atenção
	Ver as instruções de utilização
	Fabricante
	País de fabrico
	Conteúdo suficiente para <n> testes
	Controlo
	Prazo de validade
	Limites de temperatura
	Riscos biológicos
	Inflamável
	Perigo para a saúde
	Para utilização apenas com receita médica



Cepheid
 904 Caribbean Drive
 Sunnyvale, CA 94089-1189 USA
 Telephone: +1 408 541 4191
 Fax: +1 408 541 4192

