

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.

Declaraciones sobre marcas comerciales, patentes y derechos de propiedad intelectual

Cepheid®, el logotipo de Cepheid, GeneXpert®, Xpert® y Xpertise™ son marcas comerciales de Cepheid.

Las restantes marcas comerciales pertenecen a sus respectivos propietarios.

LA COMPRA DE ESTE PRODUCTO OTORGA AL COMPRADOR EL DERECHO INTRANSFERIBLE DE UTILIZARLO SEGÚN ESTE PROSPECTO. NO SE OTORGA NINGÚN OTRO DERECHO DE FORMA EXPRESA, IMPLÍCITA O POR IMPEDIMENTO LEGAL. LA COMPRA DE ESTE PRODUCTO TAMPOCO OTORGA NINGÚN DERECHO DE REVENTA.

© Cepheid 2020-2021. Reservados todos los derechos.



Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189 USA
Tel.: + 1 408 541 4191
Fax: + 1 408 541 4192
Servicio técnico gratuito: + 1 888 838 3222

Xpert[®] BCR-ABL Ultra

Para uso diagnóstico *in vitro*



1. Nombre patentado

Xpert[®] BCR-ABL Ultra

2. Denominación común o habitual

Xpert BCR-ABL Ultra

3. Indicaciones

La prueba Xpert BCR-ABL Ultra es una prueba de diagnóstico *in vitro* para la cuantificación de los transcritos de ARNm BCR-ABL1 y ABL1 en muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide crónica (LMC) positiva para t(9;22) que expresen transcritos de fusión BCR-ABL1 tipo e13a2 o e14a2. La prueba utiliza la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real, cuantitativa y automática (RT-qPCR). La prueba Xpert BCR-ABL Ultra está concebida para medir las relaciones porcentuales entre BCR-ABL1 y ABL1 en la escala internacional (IS), y también se expresa como el logaritmo de la reducción molecular (valor MR) respecto a una línea base del 100 % (IS), en pacientes con LMC positiva para t(9;22) durante el seguimiento del tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa (ITC).

La prueba no distingue entre los transcritos de fusión e13a2/b2a2 y e14a2/b3a2, ni realiza un seguimiento de otros transcritos de fusión raros derivados de t(9;22). Esta prueba no está indicada para el diagnóstico de LMC.

La prueba Xpert BCR-ABL Ultra está concebida para utilizarse únicamente en el sistema GeneXpert[®] Dx y el sistema GeneXpert Infinity de Cepheid.

4. Resumen y explicación

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una de las neoplasias hematológicas malignas más frecuentes, y representa entre el 15 % y el 20 % de todos los casos de leucemia.¹ La incidencia de LMC es de aproximadamente 1,8/100 000, lo que significa que 1 de cada 55 555 varones y mujeres será diagnosticado con esta enfermedad en el transcurso de su vida.² Más del 95 % de los pacientes con LMC tienen el distintivo cromosoma de Filadelfia (Ph1), que es el resultado de una traslocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22.² La traslocación conlleva la transferencia del gen de Abelson o ABL1 (en lo sucesivo, ABL) del cromosoma 9 a la región de agrupación de los puntos de ruptura (BCR, breakpoint cluster region) del cromosoma 22, lo cual da como resultado el gen de fusión BCR-ABL1 (BCR-ABL en lo sucesivo). El gen de fusión produce BCR-ABL, una tirosina cinasa con actividad desregulada que tiene una función clave en el desarrollo de la LMC.³ Xpert BCR-ABL Ultra detecta los transcritos de ARNm de la translocación cromosómica de la forma p210 derivada de dos puntos de ruptura principales: translocación e13a2/b2a2 y e14a2/b3a2.

La utilidad clínica del seguimiento de los niveles de ARNm de BCR-ABL mediante RT-PCR se estableció en el estudio IRIS (International Randomized Study of Interferon and STI571), en el que los pacientes recibieron tratamiento con interferón y/o un inhibidor de la tirosina cinasa (ITC). Los resultados de BCR-ABL se normalizaron a partir de un valor inicial común normalizado para los tres laboratorios que participaron en el ensayo.⁴ Posteriormente, se propuso que los ensayos de seguimiento de BCR-ABL se adaptaran a una escala internacional (IS) y se anclaran a dos valores definidos en el estudio IRIS, lo cual permitiría expresar los resultados en una escala común.⁵ El primero de estos valores es el valor inicial normalizado, que representa el 100 % (IS). El segundo es la respuesta molecular principal (MMR), que se define como una reducción de 3 unidades logarítmicas (3-log) en el valor inicial normalizado que representa el 0,10 % (IS)/MR3. Una reducción 3-log se asocia a un resultado de supervivencia favorable.⁶ De esta forma, las pruebas moleculares normalizadas a la IS pueden proporcionar una ayuda esencial a los médicos para tratar la enfermedad de los pacientes con LMC.⁶

La prueba Xpert BCR-ABL Ultra cuantifica el nivel de ARNm de BCR-ABL como porcentaje (IS) mediante la calibración del ensayo según el panel de referencia genética internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la cuantificación de ARNm de BCR-ABL. Siguiendo el protocolo recomendado⁷, Cepheid ha desarrollado y validado patrones cuantitativos secundarios, en línea con el panel de referencia primario de la OMS. Esto permite determinar un factor de conversión específico del lote, que incluye la eficiencia del ensayo (E) y un factor de escala (SF) para cada lote de kits Xpert BCR-ABL Ultra. Se realiza un seguimiento continuo de la eficacia de la calibración respecto a los patrones secundarios.

5. Principio del procedimiento

Xpert BCR-ABL Ultra es una prueba automatizada para cuantificar la cantidad de transcrito de BCR-ABL como proporción BCR-ABL/ABL. La prueba utiliza la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real, cuantitativa y automática (RT-qPCR).

La prueba se lleva a cabo en los sistemas GeneXpert Dx y GeneXpert Infinity de Cepheid. Los sistemas GeneXpert automatizan e integran la purificación de muestras, la amplificación de ácidos nucleicos y la detección de secuencias diana en muestras simples o complejas mediante ensayos de RT-PCR y PCR. Los sistemas constan de un instrumento, un ordenador y software precargado para realizar las pruebas y mostrar los resultados. Los sistemas requieren el uso de cartuchos GeneXpert desechables, de un solo uso, que contienen los reactivos para la PCR y la RT-PCR, y alojan las reacciones. Si desea obtener una descripción completa de los sistemas, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx* o el *Manual del operador del sistema GeneXpert Infinity*.

Xpert BCR-ABL Ultra incluye reactivos para detectar los genes de fusión BCR-ABL derivados de dos puntos de ruptura principales de p210, la traslocación e13a2/b2a2 y e14a2/b3a2, y el transcrito de ABL como control endógeno en muestras de sangre periférica.^{7,8,9,10,11} La cantidad de transcrito de BCR-ABL presente en la muestra de paciente se indica como proporción porcentual de BCR-ABL/ABL, y también se expresa como el logaritmo de la reducción molecular (valor MR) desde un valor inicial del 100 % en la escala internacional (IS), utilizando el software GeneXpert.

Cada prueba Xpert BCR-ABL Ultra incluye dos controles: el control endógeno ABL y el control de comprobación de la sonda (PCC). El control endógeno ABL normaliza la diana de BCR-ABL y garantiza que se utilice suficiente muestra en la prueba. El PCC verifica la rehidratación de los reactivos, el llenado del tubo de PCR, así como la presencia y funcionalidad en el cartucho de todos los componentes de la reacción, lo que incluye las sondas y los colorantes.

6. Reactivos e instrumentos

6.1 Materiales suministrados



El kit Xpert BCR-ABL Ultra (GXBCRABL-US-10) contiene reactivos suficientes para procesar 10 muestras de paciente o de control de calidad. El kit contiene lo siguiente:

Reactivos Xpert BCR-ABL Ultra

- | | |
|--|---------------------------|
| • Proteínasa K (PK) | 10 de cada por kit |
| • Reactivo de lisis (LY) (cloruro de guanidinio) | 10 x 130 µl por vial |
| • Reactivo de lavado (1) | 10 x 5,3 ml por vial |
| • Etanol | 10 x 2,9 ml por ampolla |
| • Tiocianato de guanidinio | |

Cartuchos Xpert BCR-ABL Ultra con tubos de reacción integrados

- | | |
|---|------------------------|
| • Microesferas 1, 2, 3 y 4 (liofilizadas) | 10 por kit |
| • Reactivo de enjuague | 1 de cada por cartucho |
| • Reactivo de elución | 2,0 ml por cartucho |
| | 2,5 ml por cartucho |

CD

- | | |
|---|------------------|
| • Archivo de definición del ensayo (Assay Definition File, ADF) | 1 por kit |
| • Instrucciones para importar ADF en el software GeneXpert | |
| • Instrucciones de uso (prospecto) | |

Certificado de análisis

1 por kit

Nota

Las fichas de datos de seguridad (SDS, Safety Data Sheets) están disponibles en el apartado «ASISTENCIA» (SUPPORT) de www.cephheid.com o www.cephheidinternational.com.

Nota

La albúmina sérica bovina (BSA) del interior de las microesferas de este producto se obtuvo y se fabricó exclusivamente a partir de plasma bovino originario de Estados Unidos. Los animales no fueron alimentados con proteínas de rumiantes ni con otras proteínas animales; los animales superaron las pruebas ante y post mórtem. Durante el procesamiento, no hubo mezcla del material con otros materiales de origen animal.

6.2 Materiales requeridos pero no suministrados

- Instrumento GeneXpert Dx o sistemas GeneXpert Infinity (el número de catálogo varía según la configuración): Instrumento GeneXpert, ordenador, lector de códigos de barras y manual del operador.
 - Para el sistema GeneXpert Dx: Software GeneXpert Dx versión 5.1 o posterior
 - Para los sistemas GeneXpert Infinity-80 e Infinity-48s: Software Xpertise versión 6.6 o posterior
- Impresora: Si se requiere una impresora, póngase en contacto con el servicio técnico de Cepheid para organizar la compra de una impresora recomendada.
- Agitadora vorticial
- Microcentrifugador (1000 × g mínimo)
- Pipetas y puntas de pipeta con filtro de aerosoles
- Tubos cónicos de 50 ml
- Etanol absoluto para reactivos

6.3 Materiales recomendados pero no suministrados

El Xpert BCR-ABL IS Panel C130, número de catálogo C130, es un conjunto de controles de calidad de Maine Molecular Quality Controls, Inc.

7. Conservación y manipulación



- Conserve los cartuchos Xpert BCR-ABL Ultra a una temperatura de 2 °C – 8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- No abra la tapa del cartucho hasta que esté listo para realizar el ensayo.
- No utilice cartuchos cuya fecha de caducidad haya vencido.
- El reactivo de lavado es un líquido transparente e incoloro. No utilice el reactivo de lavado si se ha vuelto turbio o ha cambiado de color.
- Veinte minutos antes de iniciar el procedimiento, saque la muestra de sangre, el cartucho y los reactivos de preparación de la muestra de su lugar de conservación y espere que a que se equilibren a la temperatura ambiente (20 °C – 30 °C).

8. Advertencias y precauciones

8.1 Generales

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Para uso exclusivo con receta.



Trate todas las muestras biológicas, incluidos los cartuchos y los reactivos usados, como si pudieran transmitir agentes infecciosos. Con frecuencia es imposible saber qué muestras podrían ser infecciosas, por lo que todas las muestras biológicas deben tratarse tomando las precauciones habituales. Las directrices para la manipulación de las muestras están disponibles en los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention)¹² y el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute)¹³ de Estados Unidos.

Siga los procedimientos de seguridad establecidos por su centro para trabajar con productos químicos y manipular muestras biológicas.

La eficacia diagnóstica de esta prueba solo se ha establecido para sangre recogida en tubos con EDTA. No se ha evaluado el rendimiento de esta prueba con otros tipos de muestra.

La fiabilidad de los resultados depende de la realización correcta de la recogida, el transporte, la conservación y el procesamiento de las muestras. La prueba puede arrojar resultados incorrectos si las muestras no se recogen, manipulan y conservan correctamente, si hay errores técnicos, si se confunden las muestras o si los transcritos de la diana en la muestra son inferiores al límite de detección de la prueba. Para evitar resultados erróneos es necesario seguir cuidadosamente las instrucciones del prospecto y el *manual del operador de los sistemas GeneXpert Dx y GeneXpert Infinity*.

Si la prueba Xpert BCR-ABL Ultra se realiza fuera del tiempo o de los intervalos de temperatura de almacenamiento recomendados, es posible que se obtengan resultados erróneos o no válidos.

Las muestras biológicas, los dispositivos de transferencia y los cartuchos usados deben ser considerados capaces de transmitir agentes infecciosos, y requieren las precauciones habituales. Siga los procedimientos de eliminación de residuos medioambientales de su centro para la eliminación adecuada de los cartuchos usados y los reactivos no utilizados. Estos materiales pueden presentar características propias de los residuos químicos peligrosos, que requieren procedimientos específicos de eliminación de carácter nacional o regional. Si las normativas nacionales o regionales no proporcionan instrucciones claras en cuanto a los procedimientos de eliminación adecuados, las muestras biológicas y los cartuchos usados deben desecharse de conformidad con las directrices de la OMS (Organización Mundial de la Salud) relativas a la manipulación y eliminación de desechos médicos.¹⁴

8.2 Muestra

Mantenga las condiciones de conservación adecuadas durante el transporte de las muestras para garantizar la integridad de las mismas (consulte el Apartado 10. Recogida, transporte y conservación de las muestras). No se ha evaluado la estabilidad de las muestras en condiciones de transporte distintas a las recomendadas.

No congele las muestras de sangre completa.

La recogida, conservación y transporte adecuados de las muestras son esenciales para obtener resultados correctos.

8.3 Prueba/reactivo

No sustituya los reactivos del Xpert BCR-ABL Ultra por otros reactivos.

No abra la tapa del cartucho del Xpert BCR-ABL Ultra salvo para añadir la muestra y el reactivo de lavado.

No utilice cartuchos que se hayan caído después de extraerlos del empaquetado.

No agite el cartucho. Si el cartucho se agita o se deja caer después de haber abierto su tapa, es posible que se obtengan resultados no válidos.

No coloque la etiqueta de identificación de la muestra sobre la tapa del cartucho ni sobre la etiqueta del código de barras del cartucho.

No utilice cartuchos con etiquetas de código de barras dañadas.

No utilice cartuchos con tubos de reacción dañados.

Se recomienda que los cartuchos de Xpert BCR-ABL Ultra estén a temperatura ambiente (20 °C – 30 °C) cuando se vayan a utilizar en la prueba.

② Cada cartucho de un solo uso de Xpert BCR-ABL Ultra se utiliza para procesar una sola prueba. No reutilice los cartuchos procesados.

② No reutilice las puntas de pipeta.

No utilice cartuchos que parezcan mojados o que tengan el precinto roto.

No utilice el cartucho de Xpert BCR-ABL Ultra si ha añadido un reactivo en la abertura equivocada.

No abra los cartuchos de Xpert BCR-ABL Ultra una vez finalizada la prueba.

Un recuento de leucocitos excesivamente alto podría provocar la acumulación de presión en el cartucho y hacer que se anule el análisis.


Dedique un juego de pipetas y reactivos exclusivamente a la preparación de las muestras.

Use guantes y bata de laboratorio limpios. Cámbiese los guantes entre la manipulación de una muestra y la de la siguiente.

En caso de un derrame de muestras o controles, póngase guantes y utilice toallitas de papel para absorber el derrame. A continuación, limpie a fondo la zona contaminada con una dilución 1:10 de lejía de uso doméstico recién preparada. La concentración de cloro activo final deberá ser del 0,5 %, independientemente de la concentración de la lejía de uso doméstico en su país. Deje un mínimo de dos minutos de tiempo de contacto. Asegúrese de que el área de trabajo esté seca antes de usar etanol desnaturalizado al 70 % para eliminar los residuos de lejía. Espere a que la superficie esté completamente seca antes de continuar. O bien, siga los procedimientos habituales del centro en caso de contaminación o derrame. Siga las recomendaciones del fabricante para la descontaminación de los equipos.

9. Peligros químicos^{15, 16}

Nota La información siguiente se refiere a todo el producto, que contiene reactivos de proteinasa K, lisis, lavado y enjuague.

- Pictograma de peligro CLP/SGA: 
- Palabra de advertencia: PELIGRO

Declaraciones de peligro del SGA de la ONU

- Líquido y vapores muy inflamables
- Provoca irritación cutánea.
- Provoca irritación ocular grave.
- Puede provocar somnolencia o vértigo.
- Se sospecha que provoca defectos genéticos.

Declaraciones de precaución del SGA de la ONU• **Prevención**

- Pedir instrucciones especiales antes del uso.
- No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad.
- Mantener alejado de fuentes de calor, chispas, llama abierta o superficies calientes. No fumar.
- Mantener el recipiente herméticamente cerrado.
- Evitar respirar las nieblas, los vapores y el aerosol.
- Lavarse concienzudamente tras la manipulación.
- Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado.
- Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
- Utilizar el equipo de protección individual obligatorio.

• **Respuesta**

- En caso de incendio: Utilizar los medios adecuados para apagarlo.
- EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar.
- Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico en caso de malestar.
- EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse.
- Se necesita un tratamiento específico (ver información adicional de medidas de primeros auxilios).
- Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.
- En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.
- EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
- Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.
- EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.
- Mantener fresco.
- Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente herméticamente cerrado.
- Guardar bajo llave.
- Eliminar el contenido/el recipiente en conformidad con los reglamentos locales, regionales, nacionales e internacionales.

10. Recogida, transporte y conservación de las muestras

- Las muestras de sangre completa deben recogerse en tubos con EDTA, siguiendo las directrices del centro. Las muestras deben conservarse a una temperatura de 4 °C durante un máximo de 3 días (72 horas) antes de realizar la prueba. No debe separarse el plasma de las células.
- La recogida, conservación y transporte correctos de las muestras son fundamentales para el rendimiento de esta prueba. La estabilidad de las muestras en condiciones de transporte y conservación distintas a las indicadas a continuación no se han evaluado con la prueba Xpert BCR-ABL Ultra.

11. Procedimiento

11.1 Antes de empezar

Veinte (20) minutos antes de empezar el procedimiento, saque la muestra de sangre y los reactivos de preparación de la muestra (incluidos los cartuchos) del lugar de conservación refrigerado y espere a que se equilibren a temperatura ambiente; centrifugue brevemente la proteinasa K (PK) en una microcentrífuga.

Importante

Si está utilizando un instrumento GeneXpert Dx, inicie la prueba antes de que haya transcurrido 1 hora desde la adición de la muestra tratada con el reactivo para muestras al cartucho. Si está utilizando un sistema GeneXpert Infinity, asegúrese de iniciar la prueba y poner el cartucho en la cinta transportadora en los 15 minutos siguientes a la adición de la muestra tratada con el reactivo para muestras al cartucho. El software Xpertise del sistema realiza un seguimiento de la vida útil restante, lo que permite que las pruebas se procesen antes de que transcurra el tiempo de caducidad de una hora en el instrumento.

Importante

Saque el cartucho del empaquetado de cartón antes de preparar la muestra. (Consulte el Apartado 11.3, Preparación del cartucho)

11.2 Preparación de la muestra

1. Añada 100 µl de proteinasa K (PK) al fondo de un tubo cónico nuevo de 50 ml.
2. Asegúrese de que la muestra de sangre esté bien mezclada, invirtiendo el tubo de recogida de sangre 8 veces inmediatamente antes de pipetear. Consulte las instrucciones del fabricante del tubo de recogida de sangre con EDTA.
3. Añada 4 ml de la muestra de sangre al tubo que ya contiene proteinasa K.
4. Agite la muestra continuamente en un mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 3 segundos.
5. Incube a temperatura ambiente durante 1 minuto.
6. Añada al mismo tubo 2,5 ml de reactivo de lisis (LY).

Nota Conserve el reactivo de lisis sobrante para utilizarlo de nuevo en el Paso 13.

7. Agite la muestra continuamente en un mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 10 segundos.
8. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
9. Agite la muestra continuamente en un mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 10 segundos.
10. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
11. Mezcle la muestra, golpeando el fondo del tubo 10 veces.
12. Transfiera 1 ml del lisado preparado a un nuevo tubo cónico de 50 ml.

Nota

El lisado sobrante puede conservarse a una temperatura de 4 °C durante 4 horas como máximo, o a -20 °C o menos durante 24 horas como máximo.

13. Añada 1,5 ml del reactivo de lisis (LY) conservado del Paso 6 al nuevo tubo cónico que contiene el lisado.
14. Agite la muestra continuamente en un mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 10 segundos.
15. Incube a temperatura ambiente durante 10 minutos.
16. Añada al mismo tubo cónico 2 ml de etanol absoluto para reactivos (suministrado por el usuario).
17. Agite la muestra continuamente en un mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 10 segundos. Déjelo a un lado.
18. Deseche los reactivos PK o LY sobrantes.

11.3 Preparación del cartucho

Para añadir la muestra al cartucho Xpert BCR-ABL Ultra:

1. Saque el cartucho del empaquetado.
2. Inspeccione el cartucho para comprobar que no esté dañado. Si está dañado, no lo utilice.
3. Levante la tapa del cartucho para abrirlo y transfiera el contenido completo de una (1) ampolla de reactivo de lavado a la cámara correspondiente (que tiene la abertura pequeña). Consulte la Figura 1.

4. Pipetee todo el contenido de la muestra preparada en la cámara de muestras (abertura grande). Consulte la Figura 1.

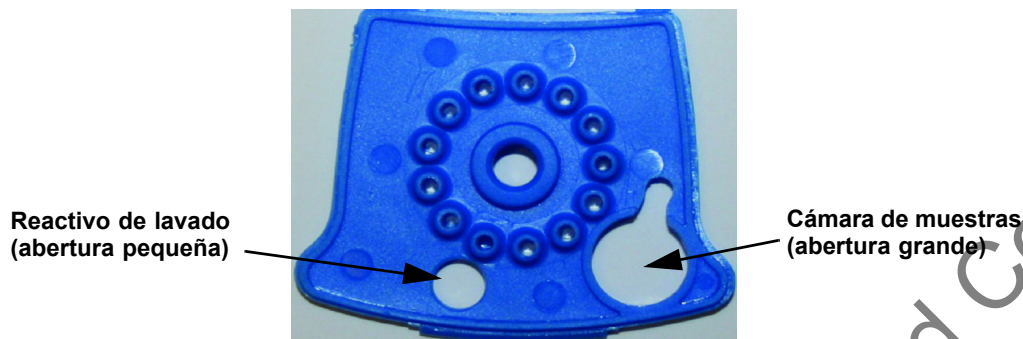


Figura 1. Cartucho Xpert BCR-ABL Ultra (vista superior)

5. Cierre la tapa del cartucho. Asegúrese de que la tapa encaje firmemente en su sitio. Inicie la prueba (consulte el Apartado 11.5, Inicio de la prueba).

11.4 Controles externos

Los controles externos descritos en el Apartado 6.3, Materiales recomendados pero no suministrados están disponibles, pero no se suministran y pueden utilizarse de acuerdo con las organizaciones de acreditación locales, provinciales/estatales y nacionales, según corresponda.

Para analizar un control utilizando la prueba Xpert BCR-ABL Ultra, lleve a cabo los pasos siguientes:

1. Deje que los controles del Xpert BCR-ABL IS Panel C130 lleguen a la temperatura ambiente (20 °C – 30 °C), unos 30 minutos.
2. Inmediatamente antes del uso, homogeneice el contenido tubo de control externo invirtiendo el tubo entre 5 y 10 veces y, a continuación, agitándolo en un mezclador vórtex de 10 a 15 segundos a velocidad media.
3. Añada 100 µl de PK (proteínasa K) al fondo de un tubo cónico nuevo de 50 ml.
4. Añada 4 ml del control externo al tubo que ya contiene proteínasa K.
5. Agite el control externo continuamente en un mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 3 segundos.
6. Incube a temperatura ambiente durante 1 minuto.
7. Añada al mismo tubo 2,5 ml de reactivo de lisis (LY).

Nota Conserve el reactivo de lisis sobrante para utilizarlo de nuevo en el Paso 14.

8. Agite el control externo continuamente en un mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 10 segundos.
9. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
10. Agite el control externo continuamente en un mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 10 segundos.
11. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
12. Mezcle el control externo, golpeando el fondo del tubo 10 veces.
13. Transfiera 1 ml de la muestra de control externo preparada a un nuevo tubo cónico de 50 ml.
14. Añada 1,5 ml del reactivo de lisis (LY) conservado del Paso 7 al nuevo tubo cónico que contiene la muestra de control externo.
15. Agite el control externo continuamente en un mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 10 segundos.
16. Incube a temperatura ambiente durante 10 minutos.
17. Añada al mismo tubo cónico 2 ml de etanol absoluto para reactivos (no suministrado).
18. Agite el control externo continuamente en un mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 10 segundos.
19. Levante la tapa del cartucho para abrirlo y transfiera el contenido completo de una (1) ampolla de reactivo de lavado a la cámara correspondiente (que tiene la apertura pequeña). Consulte la Figura 1.
20. Pipetee todo el contenido del control externo preparado en la cámara de muestras (abertura grande). Consulte la Figura 1.

21. Cierre la tapa del cartucho. Inicie la prueba (consulte el Apartado 11.5, Inicio de la prueba).

11.5 Inicio de la prueba

Importante Si está utilizando un instrumento GeneXpert Dx, inicie la prueba en la hora siguiente a la adición de la muestra al cartucho. Si está utilizando un sistema GeneXpert Infinity, asegúrese de iniciar la prueba y poner el cartucho en la cinta transportadora en los 15 minutos siguientes a la adición de la muestra al cartucho. El software Xpertise del sistema realiza un seguimiento de la vida útil restante, lo que permite que las pruebas se procesen antes de que transcurra el tiempo de caducidad de una hora en el instrumento.

Importante Antes de iniciar la prueba, asegúrese de que el sistema esté ejecutando el software GeneXpert Dx versión 5.1 o posterior, o el software Infinity Xpertise 6.6 o posterior, y de que se haya importado el archivo de definición del ensayo (ADF) Xpert BCR-ABL Ultra al software. En este apartado se enumeran los pasos predeterminados para utilizar los sistemas GeneXpert Dx y GeneXpert Infinity. Para ver instrucciones detalladas, consulte el Manual del operador del sistema GeneXpert Dx o el Manual del operador del sistema GeneXpert Infinity, según el modelo que se esté utilizando.

Nota Los pasos que debe seguir pueden variar si el administrador del sistema ha cambiado el flujo de trabajo predeterminado del sistema.

1. Encienda el sistema GeneXpert:
 - Si está utilizando el sistema GeneXpert Dx, encienda primero el instrumento GeneXpert Dx y, a continuación, encienda el ordenador. El software GeneXpert Dx se iniciará automáticamente o podría ser necesario hacer doble clic en el icono de acceso directo del software GeneXpert Dx en el escritorio de Windows®.
 - o
 - Si está utilizando el sistema GeneXpert Infinity, ponga en marcha el instrumento. El software Xpertise se ejecutará automáticamente o puede requerir que se haga doble clic en el icono del acceso directo del software Xpertise en el escritorio de Windows.
2. Inicie sesión en el software GeneXpert con su nombre de usuario y su contraseña.
3. En la ventana GeneXpert, haga clic en **Crear prueba (Create Test)** (GeneXpert Dx) o en **Solicitudes (Orders)** y **Solicitar prueba (Order Test)** (Infinity). Se abrirá la ventana Crear prueba (Create Test).
4. Escanee o escriba la Id. paciente (Patient ID) (opcional). Si escribe la Id. paciente (Patient ID), asegúrese de escribirla correctamente. La Id. paciente (Patient ID) se muestra en el lado izquierdo de la ventana Ver resultados (View Results) y está asociada a los resultados de la prueba.
5. Escanee o escriba la Id. muestra (Sample ID). Si escribe la Id. muestra (Sample ID), asegúrese de escribirla correctamente. La Id. muestra (Sample ID) se muestra en el lado izquierdo de la ventana Ver resultados (View Results) y está asociada con los resultados de la prueba.
6. Escanee el código de barras del cartucho Xpert BCR-ABL Ultra. El software utiliza la información del código de barras para rellenar automáticamente los cuadros de los campos siguientes: Id. del lote (Reagent Lot ID), N° de serie del cartucho (Cartridge S/N) y Fecha de caducidad (Expiration Date).

Nota Si el código de barras del cartucho Xpert BCR-ABL Ultra no se escanea, repita la prueba con un cartucho nuevo.

7. Haga clic en **Iniciar prueba (Start Test)** (GeneXpert Dx) o **Enviar (Submit)** (Infinity). Escriba su contraseña en el cuadro de diálogo que aparece.
8. En el sistema GeneXpert Infinity, coloque el cartucho en la cinta transportadora. El cartucho se cargará automáticamente, se realizará la prueba y el cartucho usado se colocará en el recipiente de residuos.

o

En el instrumento GeneXpert Dx:

- A. Abra la puerta del módulo del instrumento que tiene la luz verde intermitente y cargue el cartucho.
- B. Cierre la puerta. La prueba se inicia y la luz verde deja de parpadear. Una vez finalizada la prueba, la luz se apaga.
- C. Espere hasta que el sistema desbloquee la puerta del módulo antes de abrirla y retirar el cartucho.

9. Elimine los cartuchos usados en los recipientes de residuos de muestras adecuados, de acuerdo con las prácticas habituales de su centro.

Nota El resultado se obtiene en unas 2 horas.

12. Visualización e impresión de los resultados

Este apartado describe los pasos básicos para ver e imprimir los resultados. Para obtener instrucciones detalladas sobre cómo ver e imprimir los resultados, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx* o el *Manual del operador del sistema GeneXpert Infinity*.

- Haga clic en el icono **Ver resultados (View Results)** para ver los resultados.
- Una vez finalizada la prueba, haga clic en el botón **Informe (Report)** de la pantalla Ver resultados (View Results) para ver o generar un archivo de informe en formato PDF.

13. Control de calidad

CONTROL

Cada cartucho contiene un control endógeno ABL y un control de comprobación de la sonda (PCC).

Control endógeno ABL: El control endógeno ABL verifica que se haya utilizado suficiente muestra en la prueba. Además, este control también detecta la inhibición asociada a la muestra del ensayo de PCR en tiempo real. El ABL se considera superado si cumple los criterios de aceptación asignados.

Control de comprobación de la sonda (PCC): Antes de iniciar la reacción de PCR, el sistema GeneXpert mide la señal de fluorescencia de las sondas para supervisar la rehidratación de las microesferas, el llenado del tubo de reacción y la funcionalidad de todos los componentes de la reacción en el cartucho. El PCC se considera superado si cumple los criterios de aceptación asignados.

Controles externos: Se pueden utilizar controles externos de acuerdo con las organizaciones de acreditación locales, regionales y nacionales, según corresponda.

14. Interpretación de los resultados

El sistema GeneXpert interpreta automáticamente los resultados a partir de las señales fluorescentes medidas y los algoritmos de cálculo incorporados, y los muestra en la ventana Ver resultados (View Results). Los resultados y las interpretaciones posibles se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de Xpert BCR-ABL Ultra e interpretación

Resultado	Interpretación
POSITIVO (POSITIVE) Consulte la Figura 2, Figura 3, Figura 4	Se ha detectado transcrito de BCR-ABL. <ul style="list-style-type: none"> BCR-ABL POSITIVO (POSITIVE): Se ha detectado transcrito de BCR-ABL; su umbral del ciclo (Ct) está dentro del intervalo válido y su valor extremo está por encima del umbral configurado. Posibles resultados positivos: <ul style="list-style-type: none"> POSITIVO [# ,## % (IS) y MR# ,##] (POSITIVE [# .##% (IS) and MR# .##]); figura 2. POSITIVO [Por encima del LC superior] (POSITIVE [Above upper LoQ]); figura 3. POSITIVO [Por debajo del LD; >MR4.52/<0.0030 % (IS)] (POSITIVE [Below LoD; >MR4.52/<0.0030% (IS)]); figura 4. ABL – SUPERADO (PASS): Se ha detectado transcrito de ABL; su umbral del ciclo (Ct) está dentro del intervalo válido y su valor extremo está por encima del umbral configurado. Si el valor de Ct del ABL está por debajo de 18, significa que en la reacción había como mínimo 32 000 copias de ABL.^{17,18} Comprobación de la sonda SUPERADO (PASS): Todos los resultados de comprobación de la sonda son correctos.

Tabla 1. Resultados de Xpert BCR-ABL Ultra e interpretación (continuación)

Resultado	Interpretación
NEGATIVO (NEGATIVE) Consulte la Figura 5	No se ha detectado transcrito de BCR-ABL. <ul style="list-style-type: none"> • BCR-ABL NEGATIVO [Transcrito ABL suficiente] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript]): No se ha detectado transcrito de BCR-ABL y el umbral del ciclo (Ct) es superior al ciclo válido. • ABL – SUPERADO (PASS): Se ha detectado transcrito de ABL; su umbral del ciclo (Ct) está dentro del intervalo válido y su valor extremo está por encima del umbral configurado. • Si el valor de Ct del ABL está por debajo de 18, significa que en la reacción había como mínimo 32 000 copias de ABL.^{17,18} • Comprobación de la sonda SUPERADO (PASS): Todos los resultados de comprobación de la sonda son correctos.
NO VÁLIDO (INVALID) Consulte la Figura 6	No se puede determinar el nivel de transcrito de BCR-ABL. <ul style="list-style-type: none"> • NO VÁLIDO (INVALID): No se puede determinar el nivel de transcrito de BCR-ABL debido a que la muestra contiene un exceso de BCR-ABL o de transcritos de ABL. Consulte en el Apartado 17., Guía de solución de problemas las instrucciones adicionales para volver a analizar la muestra. • ABL NO SUPERADO (FAIL): El umbral de ciclo (Ct) de ABL no estaba dentro del intervalo válido o el valor extremo estaba por debajo del umbral configurado. Figura 6. Consulte en el Apartado 17., Guía de solución de problemas las instrucciones adicionales para volver a analizar la muestra. • Comprobación de la sonda – SUPERADO (PASS); todos los resultados de comprobación de la sonda son correctos.
ERROR (ERROR) Consulte la Figura 7	No se puede determinar el nivel de transcrito de BCR-ABL. Consulte el Apartado 17., Guía de solución de problemas, para obtener instrucciones adicionales para volver a analizar la muestra. <ul style="list-style-type: none"> • BCR-ABL – SIN RESULTADO (NO RESULT) • ABL – SIN RESULTADO (NO RESULT) • Comprobación de la sonda NO SUPERADO (FAIL): Todos o alguno de los resultados de comprobación de la sonda no han sido correctos. • Comprobación de la sonda SUPERADO (PASS) o N/A (no aplicable) e interrupción por presión. <ul style="list-style-type: none"> ♦ Si se superó la comprobación de la sonda o se muestra <i>IS</i>, el error se debió a que el límite máximo de presión excedió el rango aceptable o a que falló un componente del sistema.
SIN RESULTADO (NO RESULT)	No se puede determinar el nivel de transcrito de BCR-ABL. No se obtuvieron suficientes datos para producir un resultado de la prueba. Por ejemplo, esto puede ocurrir si el usuario paró una prueba que estaba en curso. Consulte el Apartado 17., Guía de solución de problemas, para obtener instrucciones adicionales para volver a analizar la muestra. <ul style="list-style-type: none"> • BCR-ABL SIN RESULTADO (NO RESULT) • ABL SIN RESULTADO (NO RESULT) • Comprobación de la sonda N/A (no aplicable)

15. Resultados cuantitativos

Con cada kit de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra se suministra un certificado de análisis que contiene una curva estándar específica del lote para el kit Xpert BCR-ABL Ultra y un valor de eficiencia (E_{ACt}). El valor de eficiencia está incorporado en el código de barras del cartucho Xpert BCR-ABL Ultra. Consulte el certificado de análisis para ver los cálculos detallados del valor de eficiencia. Cada lote del kit contiene también un factor de escala específico del lote (SF) incorporado en el código de barras, que asocia el resultado cuantitativo de la prueba a la escala internacional (IS).⁷ Los resultados de la prueba se muestran con los resultados cuantitativos tanto en % (IS) como en la escala de respuesta molecular and molecular (MR) (consulte la

Tabla 2 y la Tabla 3). Estos valores cuantitativos deben interpretarse en el contexto de la precisión de la prueba Xpert BCR-ABL (consulte el Apartado 22., Precisión y reproducibilidad).

Tabla 2. Correlación entre la reducción logarítmica, la escala internacional (IS) y la respuesta molecular (MR)

Reducción logarítmica en % 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).

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

Tabla 3. Ejemplos de resultados de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra

Prueba	BCR-ABL		ABL		Resultados de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra	Notas
	Ct	Resultado	Ct	Resultado		
1	7,1	NO VÁLIDO (INVALID)	7,3	NO SUPERADO (FAIL)	NO VÁLIDO [Transcritos BCR-ABL y ABL demasiado altos] (INVALID [Too high BCR-ABL and ABL transcripts])	Valor % calculado: 149,92 %
2	8,1	NO VÁLIDO (INVALID)	7,9	NO SUPERADO (FAIL)	NO VÁLIDO [Transcrito ABL demasiado alto] (INVALID [Too high ABL transcript])	Valor % calculado: 121,05 %
3	7,9	NO VÁLIDO (INVALID)	8,1	SUPERADO (PASS)	NO VÁLIDO [Transcrito BCR-ABL demasiado alto] (INVALID [Too high BCR-ABL transcript])	Valor % calculado: 149,92 %
4	11,4	POS	10,9	SUPERADO (PASS)	POSITIVO [Por encima del LC superior] (POSITIVE [Above upper LoQ])	Valor % calculado: 78,92 %
5	18,2	POS	13,5	SUPERADO (PASS)	POSITIVO [33,93 % (IS) y MR0,47] (POSITIVE [33.93% (IS) and MR0.47])	Valor % calculado: 33,93 %
6	21,4	POS	13,4	SUPERADO (PASS)	POSITIVO [4,68 % (IS) y MR1,33] (POSITIVE [4.68% (IS) and MR1.33])	Valor % calculado: 4,68 %
7	28,6	POS	15,2	SUPERADO (PASS)	POSITIVO [0,012 % (IS) y MR3,92] (POSITIVE [0.012% (IS) and MR3.92])	Valor % calculado: 0,012 %
8	30,0	POS	12,7	SUPERADO (PASS)	POSITIVO [Por debajo del LD; >MR4,52/<0,0030 % (IS)] (POSITIVE [Below LoD; >MR4.52/<0.0030% (IS)])	Valor % calculado: 0,0008 %
9	0	NEG	13,3	SUPERADO (PASS)	NEGATIVO [Transcrito ABL suficiente] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])	0 %
10	31,6	NO VÁLIDO (INVALID)	18,2	NO SUPERADO (FAIL)	NO VÁLIDO [Transcrito ABL insuficiente] (INVALID [Insufficient ABL transcript])	N/A
11	0	NO VÁLIDO (INVALID)	18,6	NO SUPERADO (FAIL)	NO VÁLIDO [Transcrito ABL insuficiente] (INVALID [Insufficient ABL transcript])	N/A
12	0	NO VÁLIDO (INVALID)	0	NO SUPERADO (FAIL)	NO VÁLIDO [No hay transcrito ABL] (INVALID [No ABL transcript])	N/A

Tabla 3. Ejemplos de resultados de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra (continuación)

Prueba	BCR-ABL		ABL		Resultados de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra	Notas
	Ct	Resultado	Ct	Resultado		
13	0	SIN RESULTADO (NO RESULT)	0	SIN RESULTADO (NO RESULT)	ERROR (ERROR)	Por ejemplo, Error 5017: [ABL] Comprobación de la sonda no superada

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

Se ha detectado BCR-ABL a una concentración de # ,## % (IS) y MR# ,##.

Para un resultado **POSITIVO [# ,## % (IS) y MR# ,##] (POSITIVE [# .##% (IS) and MR# .##])**, puede detectarse BCR-ABL con un valor de Ct de BCR-ABL mayor o igual a «8» y menor o igual al valor de corte de «32», y un valor de Ct de ABL mayor o igual a «8» y menor o igual a «18». El software GeneXpert calcula el % (IS) usando la siguiente ecuación, donde el valor de delta Ct (ΔCt) se obtiene del Ct de ABL menos el Ct de BCR-ABL:

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

El factor de escala (SF) es un parámetro específico del lote incorporado en el código de barras del cartucho de la prueba. El valor de este valor y la eficiencia del ensayo específica del lote ($E_{\Delta Ct}$) se determinan en pruebas de control de calidad de cada lote del ensayo, utilizando patrones secundarios calibrados según el panel de referencia genética internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la cuantificación de transcritos de BCR-ABL.⁷ En conjunto, los patrones secundarios y los valores de $E_{\Delta Ct}$ específico del lote y SF alinean el resultado cuantitativo de la prueba con el IS. La $E_{\Delta Ct}$ se establece para 1,92 y el valor de SF para 1,22, con el fin de utilizarlos en el ejemplo que se muestra aquí.

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

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

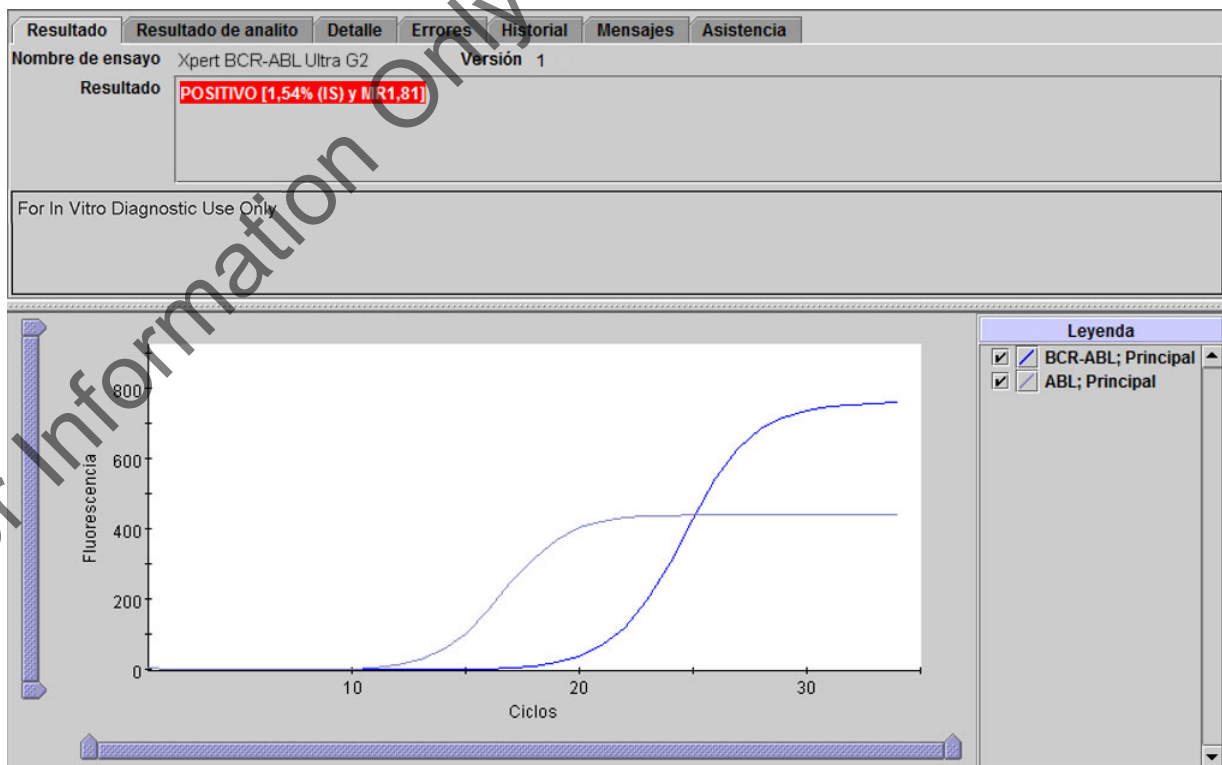


Figura 2. Ventana Ver resultados (View Results) del GeneXpert Dx: POSITIVO [1,54 % (IS) y MR1,81]

15.2 POSITIVO [Por encima del LC superior] (POSITIVE [Above upper LoQ])

Se ha detectado un nivel de BCR-ABL del >55 % (IS) y <MR0,26.

Para un resultado **POSITIVO [Por encima del LC superior] (POSITIVE [Above upper LoQ])**, puede detectarse BCR-ABL con un valor de Ct de BCR-ABL mayor o igual a «8» y menor o igual al valor de corte de «32», y un valor de Ct de ABL mayor o igual a «8» y menor o igual a «18». El software GeneXpert calcula el % (IS) usando la siguiente ecuación, donde el valor de delta Ct (ΔCt) se obtiene del Ct de ABL menos el Ct de BCR-ABL:

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

El factor de escala (SF) es un parámetro específico del lote incorporado en el código de barras del cartucho de la prueba. El valor de este factor y el de eficiencia del ensayo ($E_{\Delta Ct}$) específico del lote se determinan en pruebas de control de calidad de cada lote de ensayo mediante patrones secundarios calibrados según el panel de referencia genética internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la cuantificación del transcrito de BCR-ABL. Juntos, los patrones secundarios y los valores de $E_{\Delta Ct}$ específico del lote y SF alinean el resultado cuantitativo de la prueba con el IS. La $E_{\Delta Ct}$ se establece para 1,92 y el valor de SF para 1,10, con el fin de utilizarlos en el ejemplo que se muestra aquí.

Ejemplo: $E_{\Delta Ct}$ específico del lote = 1,92; SF = 1,10
 Ct de ABL del ensayo = 13,4; Ct de BCR-ABL = 14,2; ΔCt = -0,8
 $\% (IS) = 1,92^{(-0,8)} \times 100 \times 1,10 = 65 \%$ es mayor que el límite superior de cuantificación definido para el ensayo, del 55 % (IS)
 $MR_{x,xx} = \log_{10}[100/\% \text{ determinado } (IS)] = \log_{10}(100) - \log_{10}(65) = 2 - \log_{10}(65) = MR0,19$ es menor que el límite superior de cuantificación definido para el ensayo, de MR0,26.

Resultado: **POSITIVO [Por encima del LC superior] (POSITIVE [Above upper LoQ])**. Consulte la Figura 3.

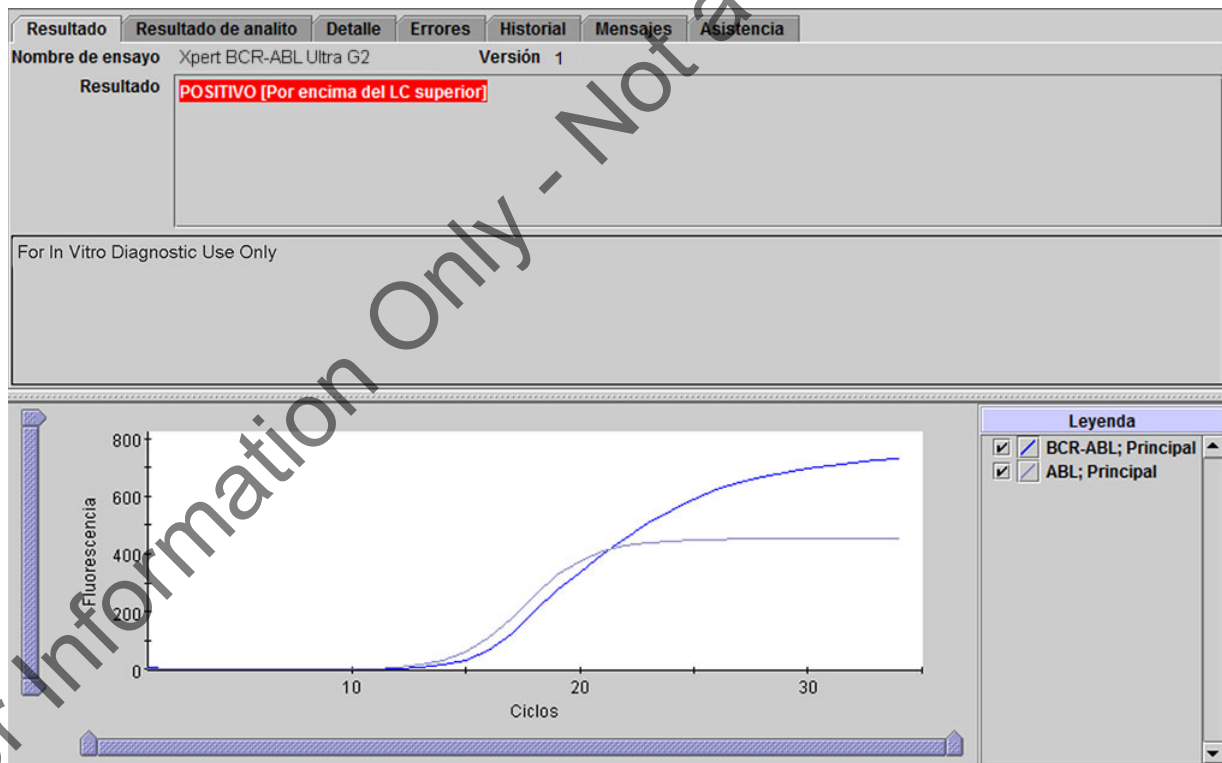


Figura 3. Ventana Ver resultados (View Results) del GeneXpert Dx: POSITIVO [Por encima del LC superior]

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

Se ha detectado un nivel de BCR-ABL del <0,0030 % (IS) y >MR4,52.

Para un resultado **POSITIVO [Por debajo del LD; >MR4,52/<0,0030 % (IS)] (POSITIVE [Below LoD; >MR4.52/<0.0030% (IS)])**, puede detectarse BCR-ABL con un valor de Ct de BCR-ABL mayor o igual a «8» y menor o igual al valor de corte de «32», y un valor de Ct de ABL mayor o igual a «8» y menor o igual a «18». El software GeneXpert calcula el % (IS) usando la siguiente ecuación, donde el valor de delta Ct (ΔCt) se obtiene del Ct de ABL menos el Ct de BCR-ABL:

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

El factor de escala (*SF*) es un parámetro específico del lote incorporado en el código de barras del cartucho de la prueba. El valor de este factor y el de eficiencia del ensayo ($E_{\Delta Ct}$) específico del lote se determinan en pruebas de control de calidad de cada lote de ensayo mediante patrones secundarios calibrados según el panel de referencia genética internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la cuantificación del transcrito de BCR-ABL. Juntos, los patrones secundarios y los valores de $E_{\Delta Ct}$ específico del lote y *SF* alinean el resultado cuantitativo de la prueba con el *IS*. La $E_{\Delta Ct}$ se establece para 1,91 y el valor de *SF* para 1,14, con el fin de utilizarlos en el ejemplo que se muestra aquí.

Ejemplo: $E_{\Delta Ct}$ específico del lote = 1,91; *SF* = 1,14
 Ct del ABL del ensayo = 12,5; Ct del BCR-ABL = 29; $\Delta Ct = -16,6$
 $\% (IS) = 1,91^{(-16,6)} \times 100 \times 1,14 = 0,0025 \%$ es menor que el límite de detección definido para el ensayo, del 0,0030 % (*IS*)
 $MR_{xx,x} = \log_{10}[100/\% \text{ determinado } (IS)] = \log_{10}(100) - \log_{10}(0,0025) = 2 - \log_{10}(0,0025) = MR4,60$ es mayor que el límite de detección definido para el ensayo, de MR4,52.

Resultado: **POSITIVO [Por debajo del LD; >MR4,52/<0,0030 % (IS)] (POSITIVE [Below LoD; >MR4.52/<0.0030% (IS)])**. Consulte la Figura 4.

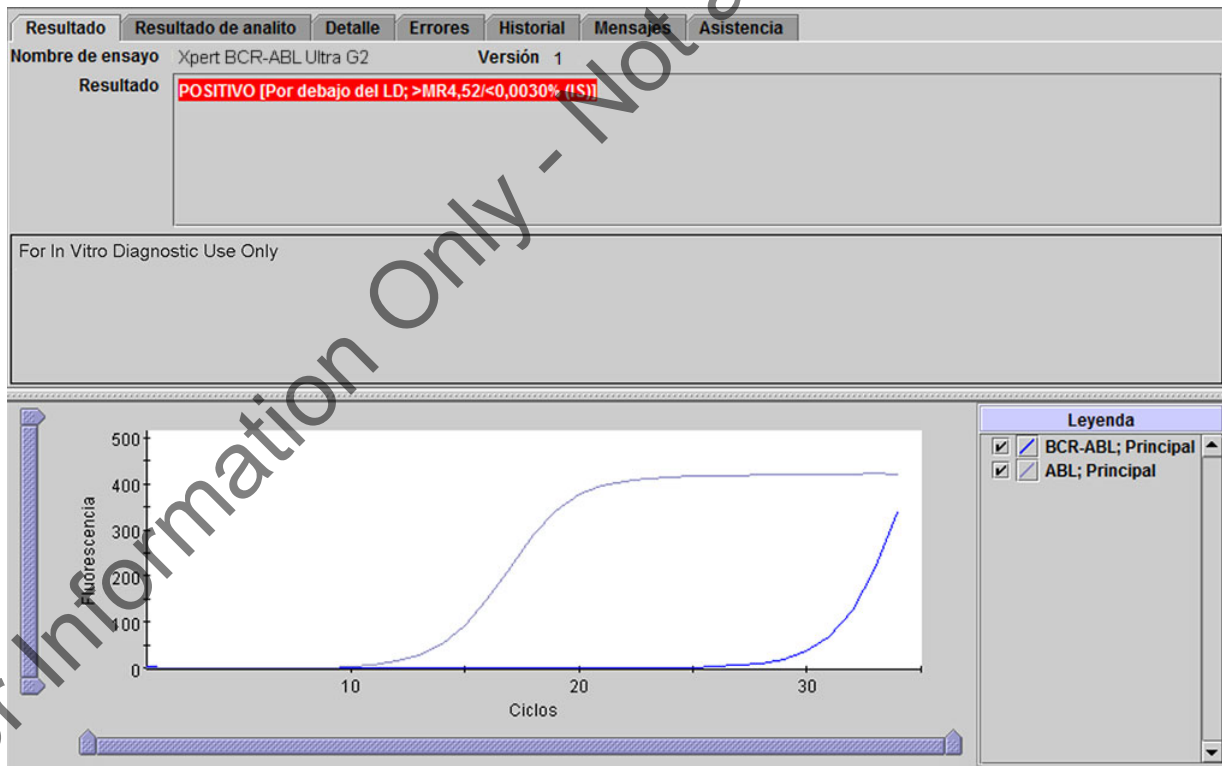


Figura 4. Ventana Ver resultados (View Results) del GeneXpert Dx: POSITIVO [Por debajo del LD; >MR4,52/<0,0030 % (IS)]

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

No se detectó BCR-ABL con un valor de Ct de BCR-ABL igual a «0» o mayor que el valor de corte de «32», y un valor de Ct de ABL mayor que «8» y menor o igual a «18».

Cuando no se detecta BCR-ABL con un valor de Ct de BCR-ABL igual a «0» o mayor que el valor de corte de «32», el software GeneXpert busca primero el valor de Ct de ABL para confirmar que sea mayor o igual a «8» y menor o igual a «18», con el fin de asegurar que haya «Transcrito ABL suficiente». Consulte el Apartado 14., Interpretación de los resultados, Tabla 1.

Ejemplo:

Ct de BCR-ABL del ensayo = 0; Ct de ABL = 11,3, que es menor que «18».

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



Figura 5. Ventana Ver resultados (View Results) del GeneXpert Dx: **NEGATIVO [Transcrito ABL suficiente]**

15.5 NO VÁLIDO [Transcrito ABL insuficiente] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

Se detectó BCR-ABL o no se detectó, con un valor de Ct de ABL mayor que «18».

Cuando BCR-ABL se detecta o no se detecta, el software GeneXpert busca primero el valor de Ct de ABL para confirmar que sea menor o igual a «18», con el fin de asegurar que haya «Transcrito ABL suficiente». Consulte el Apartado 17., Guía de solución de problemas.

Ejemplo:

Ct de BCR-ABL del ensayo = 0; Ct de ABL = 24, que es mayor que «18».

Resultado: **NO VÁLIDO [Transcrito ABL insuficiente] (INVALID [Insufficient ABL transcript])**. Consulte la Figura 6.

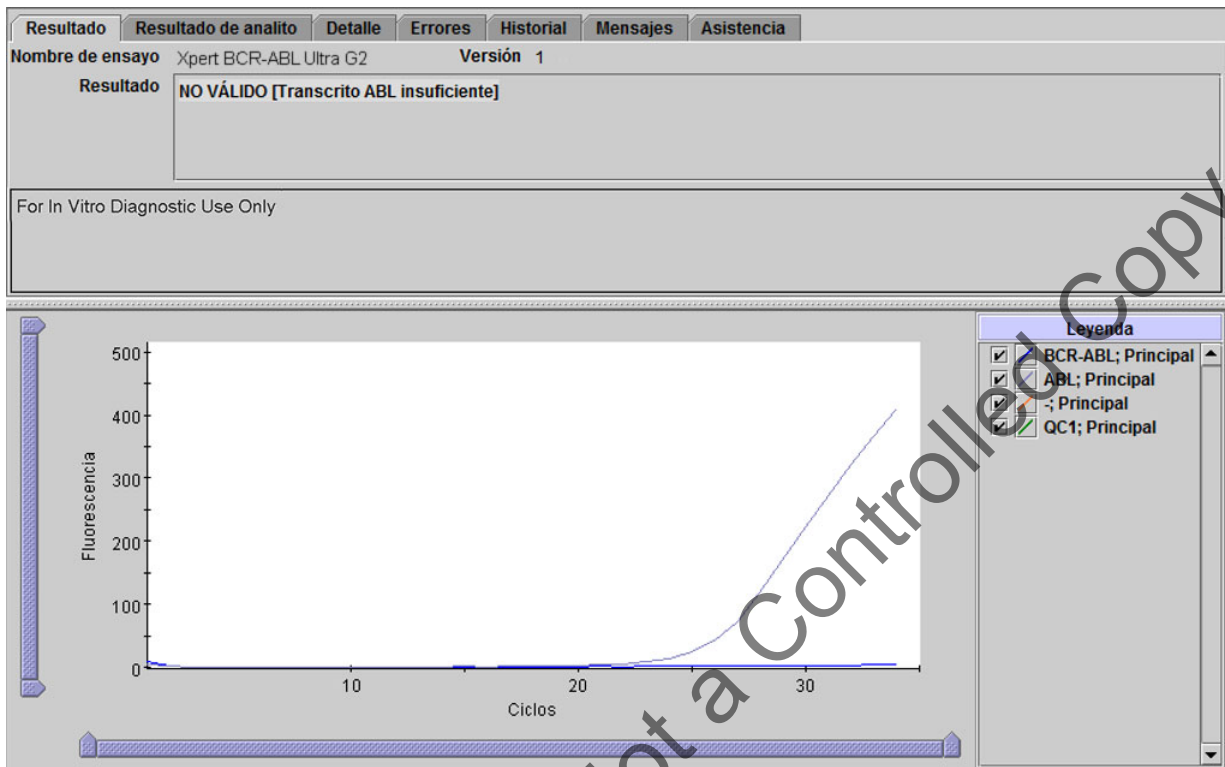


Figura 6. Ventana Ver resultados (View Results) del GeneXpert Dx: NO VÁLIDO [Transcrito ABL insuficiente]

15.6 ERROR



Figura 7. Ventana Ver resultados (View Results) del GeneXpert Dx: ERROR

16. Limitaciones del ensayo

- El producto está indicado exclusivamente para el uso diagnóstico *in vitro*.
- Precaución: La legislación federal estadounidense restringe la venta de este dispositivo a un profesional sanitario colegiado o por orden facultativa.
- El ensayo no está concebido para utilizarse con calibradores externos.
- La precisión del ensayo no se ha demostrado ni se garantiza por debajo de MR4,5.
- El ensayo no está indicado para determinar la suspensión del tratamiento con ITC ni para el seguimiento tras la suspensión del tratamiento.
- El rendimiento de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra se evaluó únicamente con los procedimientos descritos en este prospecto. Las modificaciones de estos procedimientos pueden afectar al rendimiento de la prueba.
- Este producto está validado para sangre recogida en tubos con EDTA.
- No utilice heparina como anticoagulante, ya que podría inhibir la reacción PCR.
- No se han validado tipos de muestras con citrato sódico (NaCitrato), capa leucocitaria y médula ósea.
- La prueba puede arrojar resultados erróneos si las muestras no se recogen, manipulan y conservan correctamente, o si se confunden las muestras. El estricto cumplimiento de las instrucciones de este prospecto es necesario para evitar resultados erróneos.
- La prueba Xpert BCR-ABL Ultra solamente está diseñada para detectar los transcritos de fusión e13a2/b2a2 y e14a2/b3a2 de p210 BCR-ABL, pero no para distinguir uno del otro. No se ha evaluado la capacidad para detectar otros transcritos de fusión aparte de los descritos en estas instrucciones de uso. La prueba no detecta puntos de ruptura menores o micro, microeliminaciones ni mutaciones.
- Xpert BCR-ABL Ultra no está indicado para detectar e1a2 (p190), e19a2 (p230) ni otras translocaciones menores que pudieran estar presentes en una muestra de sangre periférica de un paciente con leucemia.
- La prueba Xpert BCR-ABL Ultra no detecta transcritos de fusión e13a2/b2a2 aberrantes, en los que se eliminan partes de la secuencia adyacentes al punto de ruptura.
- En algunas muestras con un recuento de leucocitos muy elevado (superior a 30 millones de células/ml), Xpert BCR-ABL Ultra puede arrojar un resultado **NO VÁLIDO (INVALID)** (tipo 2) debido a una concentración excesiva de BCR-ABL o ABL en la muestra. Consulte Tabla 4, Guía de solución de problemas para obtener más información.
- Algunas muestras con niveles muy bajos de transcritos de ABL o concentraciones de leucocitos inferiores a 150 000 células/ml pueden notificarse como **NO VÁLIDO (INVALID)** (tipo 1). Un resultado indeterminado no excluye la presencia de niveles muy bajos de células leucémicas en el paciente.
- El transcrito CML p230 con micropunto de ruptura e19a2 puede producir un resultado positivo para BCR-ABL inferior al límite de detección del ensayo (0,0030 % [IS]/MR4,52) cuando la prueba se realiza con niveles altos de diana (>3,52 log por encima del LD).
- Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión de sondas o cebadores pueden afectar a la detección de variantes de nuevas o desconocidas, y pueden producir un resultado negativo falso.
- Algunos pacientes con niveles muy bajos de transcrito BCR-ABL1 (es decir, por debajo del LD 0,0030 % [IS] o por encima de MR4,52) pueden notificarse como **NEGATIVO [Transcrito ABL suficiente] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])**. Por tanto, un resultado No detectado no excluye la presencia de niveles bajos de células leucémicas en el paciente.
- El ensayo está validado para utilizarse en el sistema GeneXpert Dx (GX-I, GX-II, GX-IV, GX-XVI) y en el sistema GeneXpert Infinity (Infinity-48s e Infinity-80).

17. Guía de solución de problemas

Tabla 4. Guía de solución de problemas

Resultado de la prueba	Causas posibles	Sugerencias
NO VÁLIDO (INVALID)	Tipo 1: Fallo del control endógeno ABL: <ul style="list-style-type: none"> Muestra de mala calidad Inhibición de la RT-PCR Si Ct de ABL > 18 o el valor extremo <200; 	<ul style="list-style-type: none"> Compruebe la calidad de la muestra (p. ej., si se han excedido los requisitos de almacenamiento de la muestra, como el tiempo y la temperatura). Repita la prueba con la muestra original (si está disponible) o con el lisado conservado y un cartucho nuevo, siguiendo el procedimiento tal como se describe en el Apartado 18.1, Procedimiento de repetición de la prueba en caso de ERROR o NO VÁLIDO (INVALID) (tipo 1).
	Tipo 2: No se puede determinar la concentración de transcritos de BCR-ABL debido a que la muestra contiene un exceso de transcritos de BCR-ABL o de ABL (Ct < 8)	Repita la prueba con la muestra original (si está disponible) o con el lisado conservado y un cartucho nuevo, siguiendo el procedimiento tal como se describe en el Apartado 18.2, Procedimiento de repetición de la prueba en caso de ERROR (código 2008) o NO VÁLIDO (INVALID) (tipo 2).
ERROR (código 2008)	La presión excede el límite (mensaje de error 2008)	<ul style="list-style-type: none"> Compruebe la calidad de la muestra Compruebe si el recuento de LEU es muy elevado Repita la prueba con la muestra original (si está disponible) o con el lisado conservado y un cartucho nuevo, siguiendo el procedimiento tal como se describe en el Apartado 18.2, Procedimiento de repetición de la prueba en caso de ERROR (código 2008) o NO VÁLIDO (INVALID) (tipo 2).
ERROR (códigos 5006, 5007, 5008 y 5009*) * Esta no es una lista completa de códigos de ERROR.	Fallo de comprobación de la sonda	Repita la prueba con la muestra original (si está disponible) o con el lisado conservado y un cartucho nuevo, siguiendo el procedimiento tal como se describe en el Apartado 18.1, Procedimiento de repetición de la prueba en caso de ERROR o NO VÁLIDO (INVALID) (tipo 1).
SIN RESULTADO (NO RESULT)	Error en la recogida de datos. Por ejemplo, si el operador detuvo una prueba en curso o si se produjo un corte del suministro eléctrico.	Repita la prueba con la muestra original (si está disponible) o con el lisado conservado y un cartucho nuevo, siguiendo el procedimiento tal como se describe en el Apartado 18.1, Procedimiento de repetición de la prueba en caso de ERROR o NO VÁLIDO (INVALID) (tipo 1).

18. Repetición de pruebas

18.1 Procedimiento de repetición de la prueba en caso de ERROR o NO VÁLIDO (INVALID) (tipo 1)

Vuelva a analizar las muestras con resultados **ERROR** o **NO VÁLIDO (INVALID)** debido a que el umbral de ciclo (Ct) de ABL supera el valor de corte máximo válido (Ct >18) o a que el valor extremo es inferior al umbral configurado (<200). Consulte también la Tabla 4, Guía de solución de problemas.

- Si dispone de *suficiente* volumen de muestra de sangre, repita la prueba desde el tubo de recogida de muestra de sangre original, siguiendo el procedimiento del Apartado 11.2, Preparación de la muestra.
O bien,
- Si el volumen de la muestra de sangre es *insuficiente*, se puede repetir la prueba con el lisado conservado en el Apartado 11.2, Preparación de la muestra, Paso 12.

- A. Si el lisado conservado en el Apartado 11.2, Preparación de la muestra, Paso 12 se ha congelado, descongélalo a la temperatura ambiente antes de utilizarlo.
- B. Asegúrese de que el lisado esté bien mezclado, agitando la muestra en un vórtex a la velocidad máxima continuamente durante 10 segundos y dejándolo a un lado durante 3 minutos para que se asienten las burbujas. Vaya al Paso 3.
3. Transfiera 1 ml del lisado preparado a un nuevo tubo cónico de 50 ml.
4. Añada 1,5 ml de reactivo de lisis (LY) al nuevo tubo cónico que contiene el lisado.
5. Agite la muestra continuamente en un mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 10 segundos.
6. Incube a temperatura ambiente durante 10 minutos.
7. Añada al mismo tubo cónico 2 ml de etanol absoluto para reactivos (no suministrado).
8. Agite la muestra continuamente en un mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 10 segundos.
9. Levante la tapa del cartucho para abrirlo y transfiera el contenido completo de una (1) ampolla de reactivo de lavado a la cámara correspondiente (que tiene la abertura pequeña). Consulte la figura 1.
10. Pipetee todo el contenido de la muestra preparada en la cámara de muestras (abertura grande). Consulte la Figura 1.
11. Cierre la tapa del cartucho. Inicie la prueba (consulte el Apartado 11.5, Inicio de la prueba).

18.2 Procedimiento de repetición de la prueba en caso de ERROR (código 2008) o NO VÁLIDO (INVALID) (tipo 2)

Vuelva a analizar las muestras con concentraciones de transcritos de BCR-ABL o ABL por debajo del valor de corte mínimo válido ($Ct < 8$) o cuando se exceda el límite de presión. Consulte también la Tabla 4, Guía de solución de problemas.

1. Añada 100 μ l de PK (proteínasa K) al fondo de un tubo cónico nuevo de 50 ml.
2. Si dispone de *suficiente* volumen de muestra de sangre, repita la prueba desde el tubo de recogida de muestra de sangre original. Asegúrese de que la muestra de sangre esté bien mezclada, invirtiendo el tubo de recogida de sangre 8 veces inmediatamente antes de pipetear. Vaya al Paso 3.

O bien,

Si el volumen de la muestra de sangre es *insuficiente*, se puede repetir la prueba con el lisado conservado en el Apartado 11.2, Preparación de la muestra, Paso 12.

- A. Si el lisado conservado en el Apartado 11.2, Preparación de la muestra, Paso 12 se ha congelado, descongélalo a la temperatura ambiente antes de utilizarlo. Si utiliza un lisado refrigerado, espere a que se equilibre a la temperatura ambiente antes de utilizarlo.
- B. Asegúrese de que el lisado esté bien mezclado, agitando la muestra en un vórtex a la velocidad máxima continuamente durante 10 segundos y dejándolo a un lado durante 3 minutos para que se asienten las burbujas. Vaya al Paso 3.
3. Añada 50 μ l de la muestra de sangre (si está disponible) u 80 μ l del lisado sobrante del Apartado 11.2, Preparación de la muestra, Paso 12, al tubo que ya contiene proteínasa K.
 - A. Agite la muestra continuamente en un mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 3 segundos.
 - B. Incube a temperatura ambiente durante 1 minuto.
4. Añada 2,5 ml de reactivo de lisis (LY) al nuevo tubo cónico que contiene el lisado.
5. Agite la muestra continuamente en un mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 10 segundos.
6. Incube a temperatura ambiente durante 10 minutos.
7. Añada al mismo tubo cónico 2 ml de etanol absoluto para reactivos (no suministrado).
8. Agite la muestra continuamente en un mezclador vórtex a la velocidad máxima durante 10 segundos.
9. Levante la tapa del cartucho para abrirlo y transfiera el contenido completo de una (1) ampolla de reactivo de lavado a la cámara correspondiente (que tiene la abertura pequeña). Consulte la Figura 1.
10. Pipetee todo el contenido de la muestra preparada en la cámara de muestras (abertura grande). Consulte la Figura 1.
11. Cierre la tapa del cartucho. Inicie la prueba (consulte el Apartado 11.5, Inicio de la prueba).

19. Valores esperados

El rango de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra abarca los puntos de decisión clínica claves para el seguimiento de la LMC (que van de MR 1 a 4,5)⁵ con la detección cuantitativa del ARNm de BCR-ABL (transcritos e13a2/b2a2 o e14a2/b3a2) y el ARNm del control endógeno ABL. Los valores esperados están dentro del rango de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra, del 0,0030 al 55 % (IS) (MR4,52 a MR0,26).

20. Eficacia diagnóstica

20.1 Eficacia clínica

El rendimiento clínico de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra se evaluó en cuatro centros estadounidenses como parte de un estudio clínico multicéntrico. Tres centros adicionales se utilizaron únicamente como centros de recogida de muestras. El estudio se llevó a cabo con muestras de sangre completa con EDTA recogidas de forma prospectiva de pacientes con LMC en cualquier estadio de la enfermedad, después del diagnóstico inicial, con o sin exposición previa a un tratamiento con inhibidor de la tirosina cinasa u otro tratamiento para la LMC. Además, el estudio incluyó muestras sobrantes almacenadas en forma de lisados congelados, preparadas a partir de sangre completa con EDTA de la misma población de pacientes. Se comparó el rendimiento de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra con el de un ensayo molecular aprobado por la FDA que detecta y cuantifica los transcritos de ARNm de los tipos de translocación p210 (e13a2/b2a2 o e14a2/b3a2), y utiliza ABL como transcrito de ARNm de control endógeno.

Inicialmente se incluyó un total de 266 muestras aptas en el estudio, de las cuales se excluyeron 57 debido al uso de un procedimiento obsoleto en el método de extracción (27), a que no finalizó la extracción de sangre del sujeto (8), a un retraso en el envío o la prueba (6), a un volumen insuficiente para la prueba (6), al fallo de la prueba comparativa (6) o al uso de un archivo de definición del ensayo incorrecto para Xpert BCR-ABL Ultra (4), lo que deja 209 muestras analizadas.

De las 209 muestras, el 97,1 % (203/209) de los resultados del Xpert BCR-ABL Ultra fueron correctos en el primer intento y arrojaron una tasa inicial de indeterminados del 2,9 % (6/209); de estos, el 99,5 % (208/209) fueron correctos cuando se repitió la prueba, lo que da una tasa final de indeterminados del 0,5 % (1/209).

De las 208 muestras disponibles para el análisis, 150 (72,1 %) eran muestras congeladas y 58 (27,9 %) eran muestras frescas, obtenidas de forma prospectiva, que contaban con información demográfica. De las muestras frescas, 24 (41,4 %) se obtuvieron de mujeres y 34 (58,6 %) de varones. La media de edad de los sujetos que proporcionaron las muestras frescas fue de 60,5 años (rango 28-85 años).

De los 208 resultados disponibles para el análisis, 147 estuvieron dentro del rango cuantitativo notificable para ambos ensayos [0,0030 % - 55 % (IS)/MR4,52 - MR0,26 para Xpert BCR-ABL Ultra y 0,0020 % - 50 % (IS)/MR4,72 - MR0,30 para el ensayo comparativo]: 117 de estas muestras fueron de lisados sobrantes congelados y 30 fueron muestras frescas recogidas de forma prospectiva. El rendimiento de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra frente al ensayo comparativo se evaluó utilizando una regresión de Deming para determinar la pendiente y la ordenada al origen. La Figura 8 muestra los análisis de regresión de Deming y de regresión lineal de los 147 resultados del ensayo (valores MR).

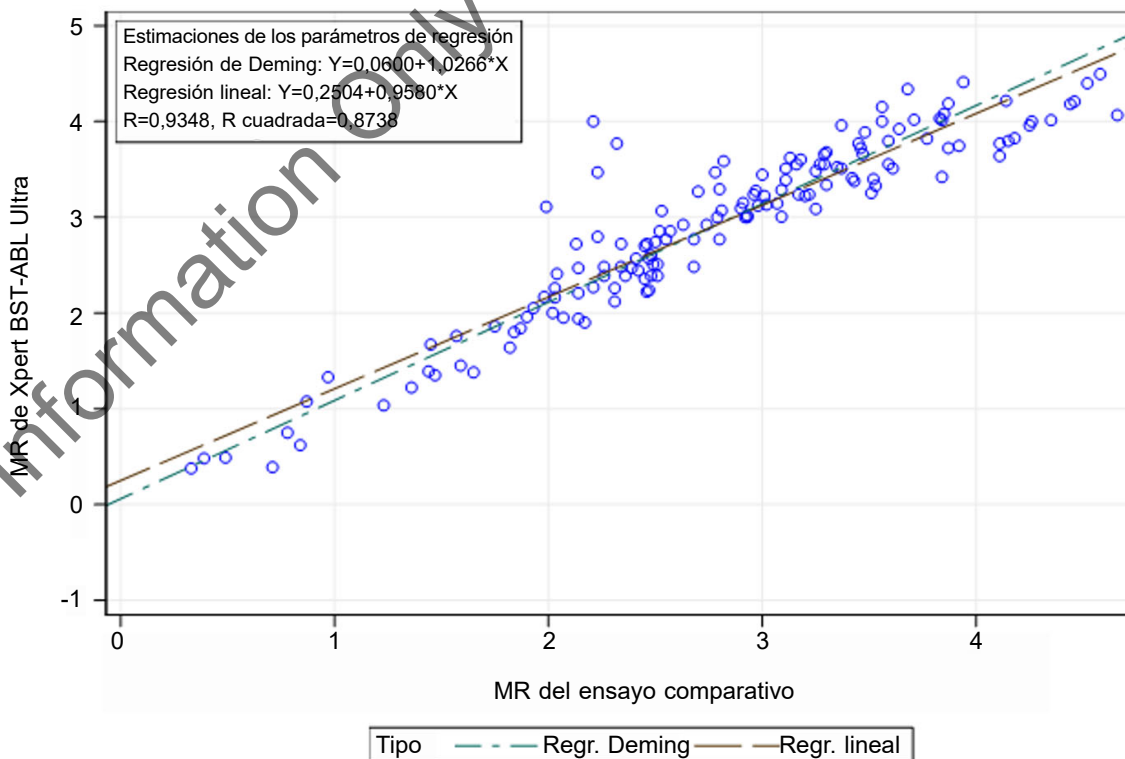


Figura 8. Análisis de regresión de Deming y lineal

La pendiente y la ordenada al origen de la regresión de Deming fueron 1,0266 y 0,0600 respectivamente. A partir de estos resultados, el sesgo previsto en la MMR (MR3) se calculó en MR0,1244 (intervalo de confianza del 95 % de 0,0969 – 0,1519).

También se llevó a cabo un análisis de diferencias de Bland-Altman con los 147 resultados cuantitativos que estuvieron dentro del intervalo notificable tanto con la prueba Xpert BCR-ABL Ultra como con el ensayo de la competencia. El gráfico de Bland-Altman (consulte la Figura 9) muestra 2 SD por encima y por debajo de la diferencia media observada. También se muestra la línea de tendencia del sesgo a través del rango de MR.

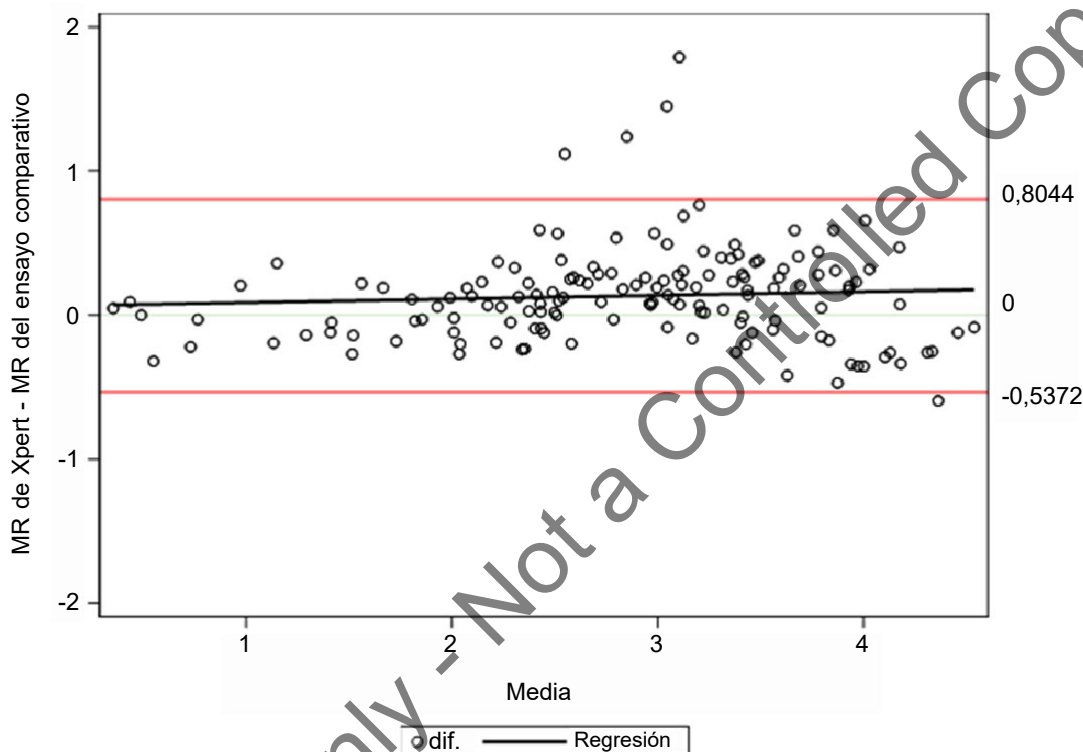


Figura 9. Análisis de diferencias de Bland-Altman entre el MR de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra y el MR de BCR-ABL del ensayo comparativo

Se calculó una diferencia media (sesgo) de 0,1336 con una SD de 0,3354. La mayoría de los resultados (96,6 %, 142/147) estuvieron dentro del rango de las 2 SD (entre -0,5372 y 0,8044).

21. Rendimiento analítico

21.1 Trazabilidad al panel de la OMS

La trazabilidad al primer panel de referencia genética internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la cuantificación de la translocación de BCR-ABL por RQ-PCR [1st World Health Organization (WHO) International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL translocation by RQ-PCR] (código NIBSC: 09/138) se demostró midiendo el panel de referencia de la OMS con 3 lotes de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra y comparando los valores medidos con los publicados en las Instrucciones de uso del panel de referencia.¹⁹ Cada uno de los 4 miembros del panel de referencia se analizó con un mínimo de 10 réplicas por lote del kit del ensayo. Los valores de MR medidos para cada concentración del panel principal de la OMS se calcularon por regresión a cada lote de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra (es decir, los miembros del panel de la OMS se trataron como muestras clínicas y se ajustaron al modelo de regresión lineal de la curva estándar del ensayo). Además, se compararon los valores de MR medidos con los valores de MR publicados a través de un análisis de regresión adicional, para determinar los valores de pendiente y ordenada al origen. La pendiente fue cercana a uno (0,96 a 1,1) y la ordenada al origen calculada fue cercana a 0 (-0,03 a -0,06).

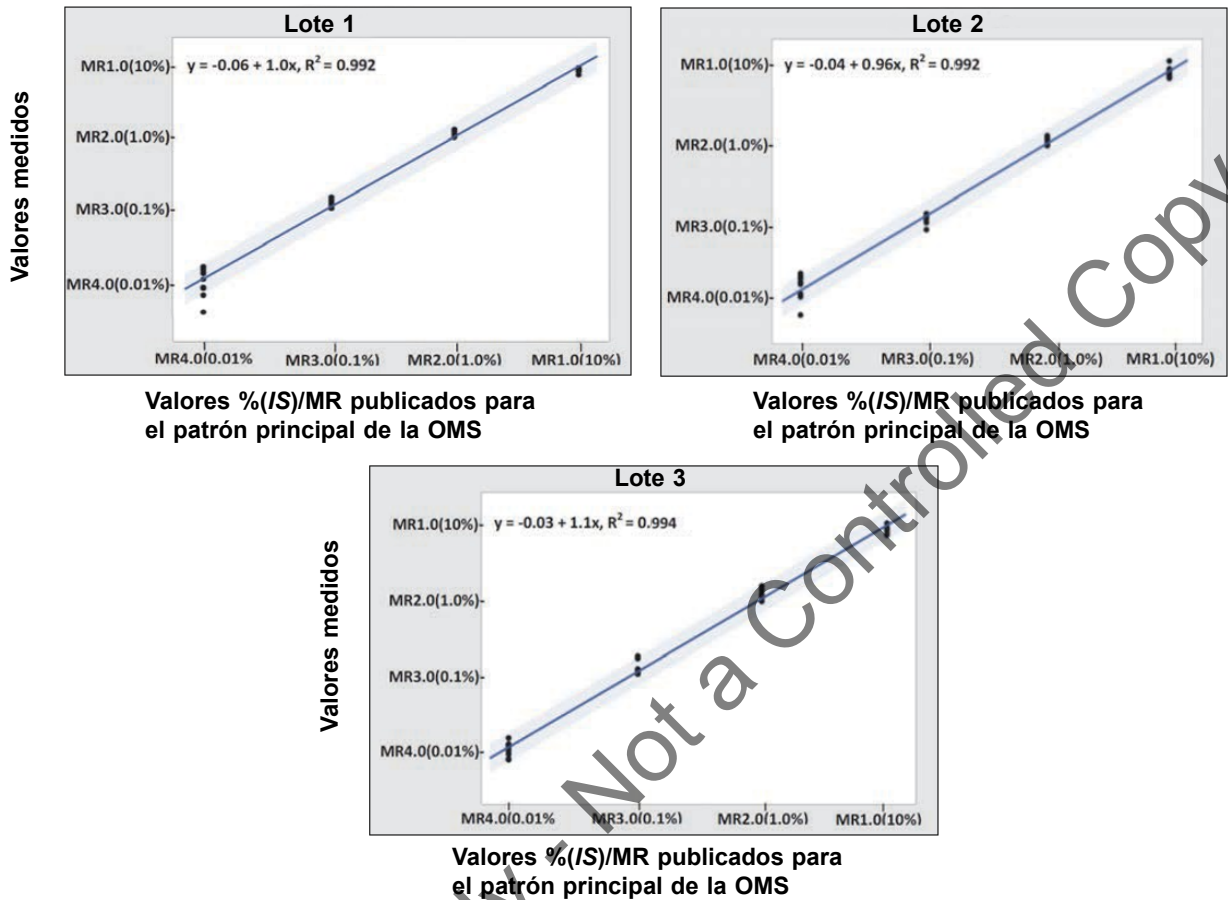


Figura 10. Valores medidos frente a publicados para el panel de referencia principal de la OMS, lote a lote.

Los valores de MR generados por el kit Xpert BCR-ABL Ultra (eje Y) se trazaron frente a los valores MR publicados en las Instrucciones de uso del panel de referencia principal de la OMS (eje X). Los tres lotes se representan con puntos de datos (negros). Los análisis de regresión y los intervalos de confianza se basan en los datos de cada lote por separado.

21.2 Linealidad y rango dinámico

La linealidad se evaluó de forma independiente para cada uno de los dos puntos de ruptura principales, e13a2/b2a2 y e14a2/b3a2, utilizando muestras clínicas de LMC específicos para una alta concentración del punto de ruptura e13a2/b2a2 o e14a2/b3a2. El lisado de cada muestra de LMC con una concentración alta de transcritos de BCR-ABL se diluyó en un lisado de fondo preparado a partir de una muestra clínica negativa para LMC con rangos diana de ~50 % (IS)/MR0,30 a 0,000625 % (IS)/MR5,20. Los miembros del panel, incluido el nivel negativo, se analizaron en dos lotes del kit del ensayo, en réplicas de 4 por lote del kit.

Las pruebas y los análisis estadísticos se realizaron de acuerdo con CLSI EP06-A. Se realizaron análisis de regresión lineal para polinomios de primer, segundo y tercer grado. Los resultados para cada punto de ruptura se consideraron lineales si los coeficientes polinómicos no eran significativos (valores de $p > 0,05$). Las curvas de regresión lineal para ambos transcritos se muestran en la Figura 11 y la Figura 12 a continuación.

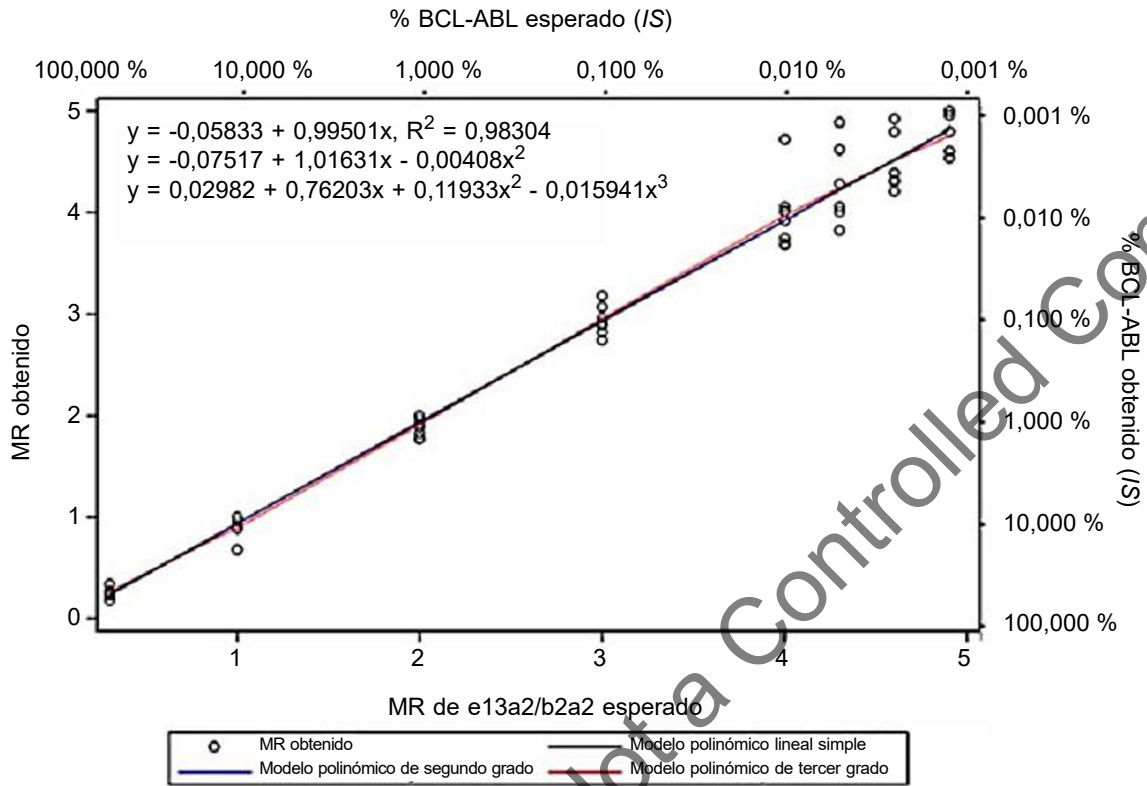


Figura 11. Curvas de regresión lineal para el transcrito de punto de ruptura e13a2/b2a2

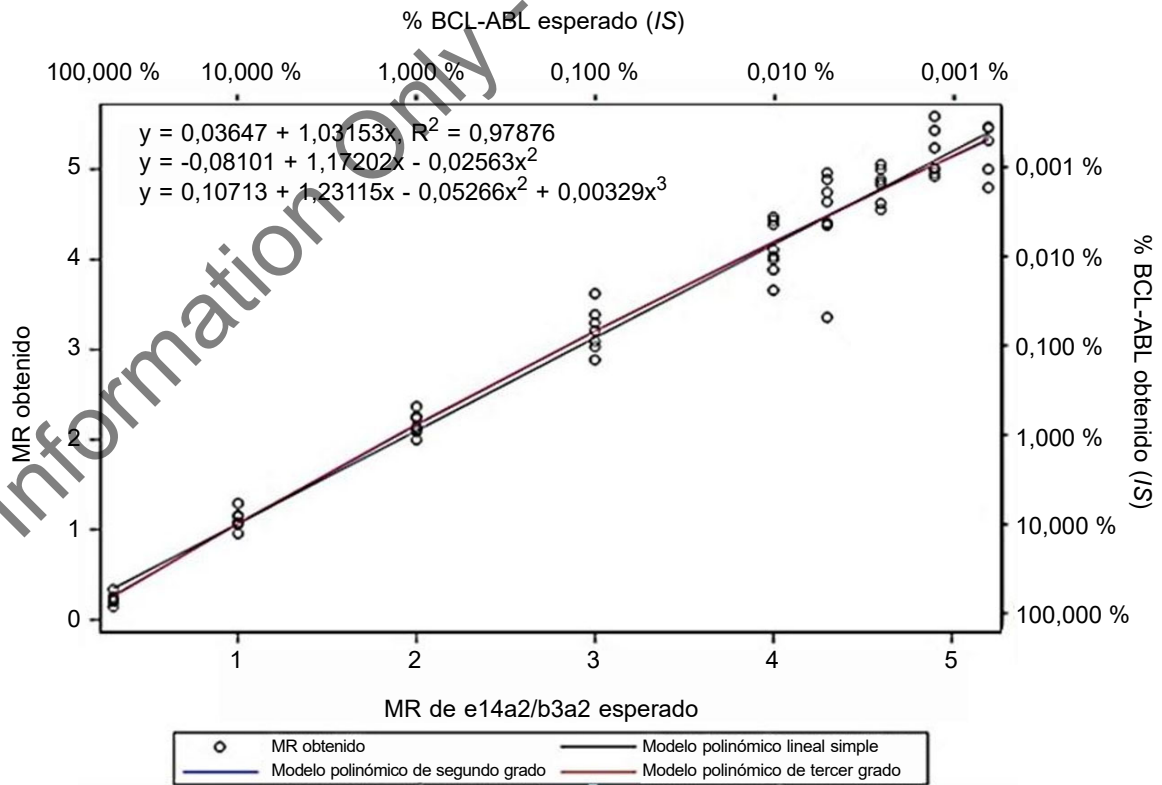


Figura 12. Curvas de regresión lineal para el transcrito de punto de ruptura e14a2/b3a2

Los valores calculados de ordenada al origen, pendiente y R^2 de la regresión del modelo lineal se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Coeficientes de regresión del modelo lineal

Punto de ruptura	Ordenada al origen	Pendiente	R^2
e13a2/b2a2	-0,05833	0,99501	0,98304
e14a2/b3a2	0,03647	1,03153	0,9788

En conjunto, los datos apoyan una observación de linealidad desde al menos el 55 % (IS)/MR 0,26 hasta ~0,0019 % (IS)/MR4,75 con una SD máxima de 0,26. El rango notificable va desde los límites de linealidad en el 55 % (IS)/MR0,26 hasta el límite de cuantificación en el 0,0030 % (IS)/MR4,52.

21.3 Sensibilidad analítica (límite de detección, límite de cuantificación, límite de blanco)

Se calculó el límite de detección (LD) para los dos puntos de ruptura, e13a2/b2a2 y e14a2/b3a2, analizando diluciones seriadas de muestras positivas altas para LMC [>10 % (IS)/MR1], así como muestras positivas bajas para LMC [$<0,1$ % (IS)/MR3]. Los datos de cada punto de ruptura de todas las diluciones y muestras se compilaron por separado y se calculó el LD mediante un análisis de regresión probit. El análisis resultante arrojó un LD estimado de 0,0035 % (IS)/MR4,45 para el punto de ruptura e13a2/b2a2 y de 0,0030 % (IS)/MR4,52 para el punto de ruptura e14a2/b3a2.

El LD se verificó adaptando el método no paramétrico descrito en el documento guía del CLSI, EP17-A2 (Tabla 6). Se diluyeron dos muestras individuales positivas para LMC que representaban cada punto de ruptura a una concentración diana de 0,0030 % (IS)/MR4,52. Para e13a2/b2a2, 2 operadores analizaron 94 réplicas con 4 lotes del kit de prueba a lo largo de 4 días. Para e14a2/b3a2, 2 operadores analizaron 101 réplicas con 4 lotes del kit de prueba a lo largo de 7 días.

Tabla 6. Límite de detección verificado en % (IS)/MR

Punto de ruptura	Positivos/réplicas	% de positivos	Mediana del % (IS)/MR
e13a2/b2a2	90/94	95,74 %	0,0030 % (IS)/MR4,52
e14a2/b3a2	97/101	96,04 %	0,0029 % (IS)/MR4,55

Debido a que la prueba Xpert BCR-ABL Ultra no distingue entre los dos puntos de ruptura, e13a2/b2a2 y e14a2/b3a2, el mayor de los dos se considera el LD del ensayo. Por lo tanto, el LD global del Xpert BCR-ABL Ultra tanto para e13a2/b2a2 como para e14a2/b3a2 es del 0,0030 % (IS)/MR4,52.

El límite de cuantificación (LC) se calculó con los datos obtenidos de los estudios de LD. La media y la desviación estándar para valores de % (IS) y los valores de MR se calcularon para las réplicas a concentraciones iguales al LD, 0,0030 % (IS)/MR4,52, o superiores con una positividad mayor o igual al 95 %. El LC del ensayo está limitado por el LD del ensayo; por lo tanto, se determinó que el LC era igual al LD, 0,0030 % (IS)/MR4,52. Los resultados se evaluaron también contra los criterios de aceptación de la desviación estándar (SD) $\leq 0,36$. La desviación estándar de MR tanto para e13a2/b2a2 (rango de SD observado, MR0,27-MR0,34) como para e14a2/b3a2 (rango de SD observado, MR0,29-MR0,31) estuvieron dentro de los criterios de aceptación.

El límite del blanco (LB) se determinó utilizando 50 muestras de donantes de sangre normales sanos, presumiblemente sin LMC, extraída en tubos con EDTA. No se observaron valores de BCR-ABL medibles con ninguna de las pruebas. Por tanto, se determinó un LB global del 0,00 % (IS).

21.4 Especificidad analítica

Se evaluó la exclusividad de la especificidad analítica y clínica de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra analizando muestras de sangre completa con EDTA extraídas de cincuenta (50) donantes sanos (sin LMC) y veinte (20) muestras leucémicas (LMA/LLA). La especificidad del punto de ruptura se determinó analizando sangre con EDTA de donantes normales sanos con cinco (5) líneas celulares de leucemia diferentes, que representaban los 3 diferentes tipos de leucemia (LMC, LLA y LPA) y 5 puntos de ruptura de la enfermedad: K562 (LMC/e14a2/b3a2) y BV173 (LMC/e13a2/b2a2) se utilizaron como controles positivos; la especificidad se evaluó en SUP-B15 (LLA/e1a2), AR230 (LMC/e19a2) y NB4 (LPA/PML-RARA).

La prueba Xpert BCR-ABL Ultra no detectó ninguna señal de BCR-ABL en ninguna de las muestras de donantes sanos sin LMC ni en las muestras de leucemia LMA/LLA evaluadas en este estudio.

Entre las líneas celulares de leucemia analizadas, las líneas celulares de LMC (K562 y BV173) con puntos de ruptura p210 principales arrojaron los resultados positivos esperados. La línea celular de LMC (AR230) con el punto de ruptura p230 e19a2 mostró un resultado **POSITIVO [Por debajo del LD; >MR4.52/<0.0030 % (IS)] (POSITIVE [Below LoD; >MR4.52/ <0.0030% (IS)])** para 1 de las 4 réplicas analizadas a la concentración diana del 10 % (IS)/MR1,00, basándose en el número de células K562. El resultado positivo de la línea celular AR230 fue para una concentración diana 3,52 logs superior al LD del ensayo y no se observó con las concentraciones más bajas, del 1 % (IS)/MR2,00 y el 0,1 % (IS)/MR3,00.

La prueba Xpert BCR-ABL Ultra es específica para el transcrito de fusión p210 BCR-ABL asociado a la LMC y tiene una especificidad analítica del 100 % para las muestras de sangre con EDTA sin LMC.

21.5 Contaminación por arrastre

Se realizó un estudio para demostrar que los cartuchos GeneXpert autónomos de un solo uso previenen la contaminación por arrastre de cartuchos analizados secuencialmente en el mismo módulo. Para demostrar esto, se analizaron muestras negativas a continuación de muestras positivas muy altas en el mismo módulo GeneXpert. Este estudio consistió en procesar una muestra normal con EDTA **NEGATIVA (NEGATIVE)** (sangre negativa para LMC) en el mismo módulo GeneXpert inmediatamente después de procesar una muestra **POSITIVA (POSITIVE)** alta (sangre positiva para LMC simulada) con $4,5 \times 10^5$ células K562/ml añadidas a sangre negativa para LMC para obtener ~10 % (IS)/MR1,00. Esta secuencia de pruebas se repitió cinco veces en cada uno de los cuatro módulos GeneXpert. Las veinte muestras positivas para BCR-ABL se notificaron correctamente como **POSITIVO [#.,## % (IS) y MR#,##] (POSITIVE [#.,##% (IS) and MR#,##])**, mientras que las veinte muestras negativas para BCR-ABL se notificaron correctamente como **NEGATIVO [Transcrito ABL suficiente] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])**.

21.6 Sustancias potencialmente interferentes

En este estudio se evaluaron cinco sustancias que podrían estar presentes en las muestras de sangre completa con EDTA y podrían interferir con el rendimiento de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra. Los compuestos y las concentraciones analizados (consulte la Tabla 7) se basaron en la guía del documento del CLSI EP07-A2. Las sustancias interferentes se analizaron en el fondo de muestras clínicas de sangre completa con EDTA con LMC que representaban tres concentraciones, con cinco muestras por concentración: >1 % (IS)/<MR2, 0,1-1 % (IS)/MR3-MR2 y <0,1 % (IS)/>MR3. Los controles de la prueba fueron muestras clínicas de sangre completa con EDTA con LMC y la concentración de transcrito BCR-ABL correspondiente, sin la sustancia interferente. Cada muestra de LMC se analizó en ausencia y presencia de las cinco sustancias interferentes individuales, en 4 réplicas por condición.

Se consideró que una sustancia no era interferente si en su presencia la relación % medio (IS)/MR observada estaba dentro de una diferencia de 3 veces, en comparación con el control.

No se observaron efectos inhibidores clínicamente significativos sobre la prueba Xpert BCR-ABL Ultra con ninguna de las sustancias interferentes evaluadas en este estudio. Aunque se observó cierta variabilidad y diferencias estadísticamente significativas (valor de $p < 0,05$) en algunas condiciones analizadas, las proporciones % (IS)/MR notificadas para las condiciones de prueba y control estuvieron dentro del rango aceptable de 3 veces.

Tabla 7. Sustancias potencialmente interferentes analizadas con la prueba Xpert BCR-ABL Ultra

Sustancias interferentes	Concentración analizada
Bilirrubina no conjugada	20 mg/dl
Colesterol, total	500 mg/dl
Triglicéridos, total (lípidos)	1800 mg/dl
Heparina	3500 U/l
EDTA (extracción corta)	750 mg/dl (5X)

22. Precisión y reproducibilidad

La precisión y la reproducibilidad de la prueba Xpert BCR-ABL Ultra se evaluaron en un estudio multicéntrico según se indica en las guías CLSI EP05-A3, «Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline» y CLSI EP15-A3, «User Verification of Performance for Precision and Trueness, Approved Guideline».

Se preparó un panel de once muestras que incluía lo siguiente: Una muestra negativa para BCR-ABL, dos muestras cerca del límite de detección (LD) y ocho muestras con niveles de respuesta molecular (MR) 1-4, utilizando las dos dianas detectadas por la prueba Xpert BCR-ABL Ultra: e13a2/b2a2 y e14a2/b3a2. El panel de muestras se obtuvo diluyendo un lisado a granel de muestras con un alto %BCR-ABL/ABL de pacientes con LMC en sangre completa combinada, recogida de donantes sanos, hasta obtener la concentración deseada.

Tabla 8 muestra las once muestras incluidas en este estudio.

Tabla 8. Panel de reproducibilidad para Xpert BCR-ABL Ultra

N.º de muestra	Descripción	% (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)
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	Cerca del LD e13a2/b2a2	BCR-ABL a ~ 0,005 % (IS)
10	Cerca del LD e14a2/b3a2	BCR-ABL a ~ 0,005 % (IS)
11	Negativo	BCR-ABL no detectado

Cada uno de los once miembros del panel se analizó por duplicado dos veces al día en cuatro días diferentes por cada uno de los tres operadores distintos en tres centros diferentes. Se utilizaron tres lotes de kits Xpert BCR ABL Ultra y cada operador realizó las pruebas con un lote (3 centros x 3 lotes x 1 operador/lote x 4 días x 2 análisis/operador x 2 réplicas/análisis = 144 réplicas/miembro del panel).

Los resultados cuantitativos se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) y se identificaron los componentes principales de la varianza.

Los análisis ANOVA para cada miembro del panel se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Estudio de reproducibilidad: Resultados del análisis de varianza

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

- a. La prueba Xpert BCR-ABL Ultra realizada en los sistemas GeneXpert Dx y GeneXpert Infinity integra la purificación de muestras y la amplificación de ácidos nucleicos. La variabilidad global de la prueba observada en este estudio (expresada como SD total) incluye la variabilidad aportada tanto por la preparación de la muestra en el instrumento como por los pasos de RT-qPCR.
- b. Se eliminó del análisis una réplica que cumplió los requisitos de valor atípico a la concentración del 99 % según CLSI EP15-A3.

- c. 4 muestras de los 144 resultados de la prueba dieron un resultado NEGATIVO (NEGATIVE).
- d. 1 muestra de los 144 resultados de la prueba dio un resultado NEGATIVO (NEGATIVE).

La desviación estándar total observada para las muestras en MR1, MR2 y MR3 fue $\leq 0,15$. La desviación estándar total máxima observada para las muestras cercanas al LD y MR4 fue de 0,33.

23. Bibliografía

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/cm1.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. Ubicación de las oficinas centrales de Cepheid

Oficinas centrales corporativas

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

Oficinas centrales europeas

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

25. Asistencia técnica

Antes de ponerse en contacto con el Servicio técnico de Cepheid, reúna la información siguiente:

- Nombre del producto
- Número de lote
- Número de serie del instrumento
- Mensajes de error (si los hubiera)
- Versión de software y, si corresponde, «Service Tag» (número de servicio técnico) del ordenador.

Información de contacto

Estados Unidos
Teléfono: + 1 888 838 3222

















Correo electrónico: techsupport@cepheid.com

Francia
Teléfono: + 33 563 825 319

Correo electrónico: support@cepheideurope.com

La información de contacto de todas las oficinas del servicio técnico de Cepheid está disponible en nuestro sitio web:
www.cepheid.com/en/CustomerSupport.

26. Tabla de símbolos

Símbolo	Significado
	Número de catálogo
	Solo para uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	No volver a utilizar
	Advertencia
	Consultar las instrucciones de uso
	Fabricante
	País de fabricación
	Contiene una cantidad suficiente para <n> pruebas
	Control
	Fecha de caducidad
	Límites de temperatura
	Riesgos biológicos
	Inflamable
	Peligro para la salud
	Para uso exclusivo con receta



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



For Information Only - Not a Controlled Copy